



UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO
DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**ESTABLECIMIENTO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO
PARA LA DETERMINACIÓN DE MANCOZEB
(ETILENBISDITIOCARBAMATO DE ZINC Y MANGANESO) EN
AGUA.**

TESIS

Para obtener el título de:

Maestro en Ingeniería y Protección Ambiental

Presenta:

Lourdes Lavariega Pulido

Directores:

Dra. Verónica Isidra Domínguez Rodríguez

Dr. Randy Howard Adams Schroeder

Villahermosa, Tabasco, México

Marzo, 2018



**UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO**

“ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE”



**DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIRECCIÓN**

FEBRERO 28 DE 2018

**C. LOURDES LAVARIEGA PULIDO
PAS. DE LA MAESTRÍA EN INGENIERÍA Y PROTECCIÓN
AMBIENTAL
P R E S E N T E**

En virtud de haber cumplido con lo establecido en los Arts. 80 al 85 del Cap. III del Reglamento de titulación de esta Universidad, tengo a bien comunicarle que se le autoriza la impresión de su Trabajo Recepcional, en la Modalidad de Tesis de Maestría en Ingeniería y Protección Ambiental titulado: **“ESTABLECIMIENTO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE MANCOZEB (ETILENBISDITIOCARBAMATO DE ZINC Y MANGANESO) EN AGUA”**, asesorado por la Dra. Verónica Isidra Domínguez Rodríguez y Dr. Randy Howard Adams Schroeder sobre el cual sustentará su Examen de Grado, cuyo jurado está integrado por el Dr. Raúl German Bautista Margulis, M. en C. Carlos Alberto Torres Balcázar, Dra. Verónica Isidra Domínguez Rodríguez, M. en C. Deysi del Carmen Marín García y Dr. Randy Howard Adams Schroeder.

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE

**M. EN C. ROSA MARTHA PADRON LOPEZ
DIRECTORA**

UJAT
DIVISIÓN ACADÉMICA
DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



C.c.p.- Expediente del Alumno.
C.c.p.- Archivo

CARTA AUTORIZACIÓN

El que suscribe, autoriza por medio del presente escrito a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco para que utilice tanto física como digitalmente el Trabajo Recepcional en la modalidad de Tesis de Maestría denominado: **“ESTABLECIMIENTO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE MANCOZEB (ETILENBISDITIOCARBAMATO DE ZINC Y MANGANESO) EN AGUA”**, de la cual soy autor y titular de los Derechos de Autor.

La finalidad del uso por parte de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco el Trabajo Recepcional antes mencionada, será única y exclusivamente para difusión, educación y sin fines de lucro; autorización que se hace de manera enunciativa más no limitativa para subirla a la Red Abierta de Bibliotecas Digitales (RABID) y a cualquier otra red académica con las que la Universidad tenga relación institucional.

Por lo antes manifestado, libero a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco de cualquier reclamación legal que pudiera ejercer respecto al uso y manipulación de la tesis mencionada y para los fines estipulados en éste documento.

Se firma la presente autorización en la ciudad de Villahermosa, Tabasco el Día 28 de Febrero de 2018.

AUTORIZO



LOURDES LAVARIEGA PULIDO

AGRADECIMIENTOS

A mis padres:

A Mamá, por tu gran dedicación a mí, por enseñarme a ser una buena persona, por dar todo a tus hijos, tu cariño, amor, proveedora incansable y excelente ser humano, siempre alentando mis sueños y festejando mis logros.

A Papá, por tu gran cariño y amor, por sentirme siempre orgulloso de mí.

A Abuelita Yoya (ZEPD), por amarme y cuidarme incondicionalmente, por enseñarme valores, el principal, el amor a Dios Todo Poderoso.

A mis hermanos:

A Yadira por tu infinito apoyo, sin el cual, no hubiera sido posible tanto de lo que he logrado en la vida, más que una hermana eres para mí una segunda madre y ejemplo de mujer empoderada que siempre me ha servido de guía, hermana Luna.

A Silvia, con tu infinita sabiduría, que te ha regalado la vida y tu amor por la misma, me enseñaste que nunca hay que rendirse y que la batalla más difícil, es la que haces contra ti mismo.

A Camilo, por tu gran cariño, paciencia y amor para conmigo, por esa gran paz que tienes, que con una sola sonrisa y un abrazo tuyo, sé que todo va a estar bien, por enseñarme que no hay que decir mucho (hombre de pocas palabras), hay que actuar más.

A mis sobrinas Karla Anahy y Valery

Por ser esa fuente inagotable de amor y porristas incansables, que me motivaron a concluir este proyecto, gracias por creer y confiar en mí, las amo infinitamente.

A mis Directores de Tesis,

Dra. Vero y Dr. Randy, por ser quienes me guiaron con paciencia y tolerancia, confiando en mí, para que se concluyera este proyecto, proporcionándome todos los recursos materiales, humanos y espirituales que se requerían, pero sobre todo, por esa gran capacidad que tienen de transmitir el conocimiento de forma tal que hace que ames la ciencia y el amor que me proporcionaron.

A Tony y Zadkiel, por regalarme el tiempo de sus papis, les quiero chicos.

A todas las personas que contribuyeron en el desarrollo de este trabajo, mis compañeros del Laboratorio de Remediación, pero con principal agradecimiento a la M. en C. Daysi Marín, por todo tu apoyo y sugerencias, a la C.P. Norma, por estar siempre dispuesta a apoyarme por su amabilidad y atención, a la M.I.P.A. Lily, por estar siempre atenta a lo que se requería y a todos los demás, les estaré muy agradecida por sus atenciones: Al M. en I. Francisco, Ing. Ana, Ing. Pascual, Ing. Armando, Ing. Juan Pablo, Ing. Fidel, M. en I. Paulo, Ing. Gerónimo, Ing. Marianita, Ing. Fany y Martha.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN.	1
2.	JUSTIFICACIÓN.	2
3.	MARCO TEÓRICO.	3
	3.1. Normas y Guías existentes.	3
	3.2. Métodos analíticos existentes para la detección de carbamatos.	4
	3.3. Fundamento de la técnica instrumental.	5
	3.3.1. Ley de Lambert-Beer.	6
	3.3.2. Espectroscopia de absorción en el ultravioleta.	7
	3.3.3. Características de un espectrofotómetro.	8
	3.3.4. Obtención de un espectro de absorción.	9
	3.3.5. Aplicaciones.	10
	3.4. Validación de métodos analíticos.	10
	3.4.1. Parámetros de desempeño para la validación interna del método.	11
	3.4.1.1. Confirmación de la identidad.	12
	3.4.1.2. Linealidad.	12
	3.4.1.3. Límite de detección (LoD).	13
	3.4.1.4. Límite de cuantificación (LoQ).	13
	3.4.1.5. Porcentaje de recuperación.	14
	3.4.2. Validación del modelo de calibración.	14
	3.4.2.1. Validación cruzada del método.	14
	3.5. Plaguicidas.	15
	3.5.1. Clasificación de los plaguicidas.	15
	3.5.2. Clasificación Toxicológica de los plaguicidas.	16
	3.6. Mancozeb (Etilenbisditiocarbamato de Zinc y Manganeso).	17
	3.6.1. Propiedades físicas y químicas de Mancozeb.	17
	3.6.2. Modo y mecanismo de acción de Mancozeb.	18
	3.6.3. Espectro de acción de Mancozeb.	18
	3.6.4. Manejo de la resistencia y clasificación FRAC.	20
	3.6.5. Efectos toxicológicos del Mancozeb.	20
	3.6.6. Evaluación del riesgo ambiental por uso de Mancozeb.	21
	3.6.7. Exposición de organismos acuáticos al Mancozeb.	22
	3.6.8. Toxicidad aguda en organismo acuáticos por exposición a Mancozeb.	24
	3.6.9. Toxicidad crónica en organismo acuáticos por exposición a Mancozeb.	24
	3.6.10. Riesgo para los organismos acuáticos por Mancozeb.	25
	3.6.11. Exposición al plaguicida Mancozeb por medio del agua potable.	28
	3.6.12. Criterios de aplicación, manejo y seguridad de Mancozeb.	28
4.	HIPÓTESIS.	30
5.	OBJETIVOS.	30

5.1.	Objetivo general.	30
5.2.	Objetivos específicos.	30
6.	ÁREA DE ESTUDIO.	31
7.	MÉTODO.	33
7.1.	Materiales y reactivos.	33
7.2.	Equipos.	33
7.3.	Confirmación de la identidad.	34
7.4.	Validación interna del método.	34
7.4.1.	Linealidad.	34
7.4.2.	Límite de detección (LoD).	35
7.4.3.	Límite de cuantificación (LoQ).	35
7.4.4.	Porcentaje de recuperación.	36
7.5.	Validación del modelo de calibración.	37
7.5.1.	Validación cruzada del método.	37
7.5.2.	Prueba t-Student para datos apareados.	37
8.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	38
8.1.	Confirmación de la identidad.	38
8.2.	Validación interna del método.	38
8.2.1.	Linealidad.	38
8.2.2.	Límite de Detección (LoD).	39
8.2.3.	Límite de Cuantificación (LoQ).	40
8.2.4.	Porcentaje de recuperación.	40
8.3.	Validación del modelo de calibración.	41
8.3.1.	Validación cruzada.	41
8.7.	Prueba t-Student.	42
9.	CONCLUSIÓN.	43
10.	REFERENCIAS.	45
11.	ACRÓNIMOS COMUNMENTE USADOS.	48
12.	ANEXO FOTOGRÁFICO.	49

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Métodos existentes para la determinación de Carbamatos.	5
Cuadro 2.	Clasificación de los plaguicidas por organismos que controlan.	15
Cuadro 3.	Clasificación de los plaguicidas por su composición química.	16
Cuadro 4.	Clasificación toxicológica de los plaguicidas por su riesgo.	16
Cuadro 5.	Propiedades físicas y químicas de Mancozeb.	17
Cuadro 6.	Espectro de acción de Mancozeb.	19
Cuadro 7.	Información toxicológica de Mancozeb.	20
Cuadro 8.	Efectos irritantes cáusticos de Mancozeb.	20
Cuadro 9.	Efectos por exposición prolongada a Mancozeb.	21
Cuadro 10.	Niveles de Cuidado (LOCs) para riesgos Ecotoxicológicos.	22
Cuadro 11.	Concentraciones ambientales estimadas (EECs) de Mancozeb en agua	23
Cuadro 12.	Toxicidad aguda de Mancozeb para los organismos acuáticos.	24
Cuadro 13.	Toxicidad crónica de Mancozeb para organismos de agua dulce.	25
Cuadro 14.	Riesgos para los organismos acuáticos de agua dulce por Mancozeb.	26
Cuadro 15.	Riesgos agudos para los organismos acuáticos estuarinos / marinos por Mancozeb.	27
Cuadro 16.	Incidentes ecológicos por envenenamiento con Mancozeb.	27
Cuadro 17.	Concentraciones estimadas de ETU para agua potable.	28
Cuadro 18.	Equipo, material y reactivo utilizado en la estandarización del método.	33
Cuadro 19.	Datos del porcentaje de recuperación de Mancozeb en muestras analizadas.	41
Cuadro 16.	Prueba t-Student.	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Atenuación de un haz de radiación por una solución absorbente.	6
Figura 2.	Gráfico de espectro de absorción.	9
Figura 3.	Proceso de evaluación del criterio de desempeño y confirmación de método.	11
Figura 4.	Fórmula estructural del Mancozeb.	18
Figura 5.	Equipo de protección personal para el manejo de Mancozeb.	29
Figura 6.	Mapa del área de estudio.	32
Figura 7.	Preparación de diluciones de la solución concentrada con el analito Mancozeb.	35
Figura 8.	Colecta de muestras.	36
Figura 9.	Espectro de absorción de Mancozeb.	38
Figura 10.	Calibración del método.	39
Figura 11.	Coefficiente de regresión y determinación entre las variables de concentración de Mancozeb y unidades de absorbancia.	42

1. INTRODUCCIÓN.

El uso de plaguicidas en la agricultura tiene gran importancia para la producción de alimentos, se utilizan para el control de hongos en frutas, vegetales, semillas de cereales y ornamentales; también en el tratamiento post-cosecha y durante el embalaje de diversos productos agrícolas destinados a la exportación (Corra, 2009). Surgen entre 1930 y 1940 como resultado de investigaciones enfocadas al desarrollo de armas químicas que originalmente fueron probadas en insectos, uno de los primeros compuestos, el diclorodifeniltricloroetano (DDT) fue sintetizado por Zeidler en 1874, se utilizó por primera vez durante la segunda guerra mundial para proteger a los soldados estadounidenses contra enfermedades transmitidas por vector y se comercializó en los Estados Unidos de América en 1945 (Ramírez y Lacasaña, 2001).

Los plaguicidas están diseñados para matar, reducir o repeler los insectos, hierbas, roedores, hongos y otros organismos que puedan amenazar la salud pública y la economía de las naciones. Cuando se manejan o depositan inadecuadamente, estos químicos pueden afectar la salud humana. Los principales riesgos ligados a la salud humana se relacionan con la aparición de cáncer, defectos de nacimiento, afecciones del sistema nervioso y del funcionamiento endocrino (Corra, 2009), pero estas sustancias también han traído beneficios a la salud del hombre, al ayudar a combatir plagas que ponen en riesgo la salud de las personas.

Los Ditiocarbamatos son fungicidas ampliamente utilizados en la agricultura y pueden ser clasificados en tres grupos, dependiendo de su estructura química siendo los Dimetilditiocarbamatos (Ferbam, Thiram y Ziram), Etilenbisditiocarbamatos (Mancozeb, Maneb, Metiram, Nabam y Zineb) y Propilenbisditiocarbamatos (Propinèb) (FAO, 2007). Mancozeb (Etilenbisditiocarbamato de Manganeso) es un plaguicida que se utiliza para el control de enfermedades fungosas, una de ellas es la Sigatoka Negra (Rivas y Rosales,

2003); Cabe destacar, que en el Estado de Tabasco, se utiliza el Mancozeb (Etilenbisditiocarbamato de Manganeso), para la protección del cultivo de plátano. La importancia de establecer un método para cuantificar este plaguicida en el agua radica principalmente que a nivel regional no se cuenta con un laboratorio que realice este análisis.

Los métodos analíticos a utilizar en un laboratorio deben de estar validados, con ello se garantiza la calidad de los resultados, al asegurar su confiabilidad, por medio de la determinación de la eficiencia del ensayo, motivo por el cual se han emitido guías y normas nacionales e internaciones que permiten el establecimiento y la ejecución de los métodos analíticos.

El propósito de este trabajo de investigación consistió en establecer y validar un método analítico para la determinación de Mancozeb (Etilenbisditiocarbamato de Manganeso) presente en el agua, por medio de espectrometría Ultravioleta (UV). Éste método propuesto incorpora mejoras a los ya establecidos; por ser confiable, práctico, económico y amigable con el ambiente, al evitar la generación de residuos químicos como disolventes de extracción.

2. JUSTIFICACIÓN.

Mancozeb es un plaguicida que se utiliza en varias regiones de México en diversos cultivos, tales como el de tomate, pepino y hortalizas en general, en el Estado de Tabasco se emplea principalmente para combatir la Sigatoka Negra causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis Morelet*, la enfermedad más importante de los bananos y plátanos (Pérez *et al.*, 2000).

El Mancozeb está considerado como precursor de metabolitos secundarios cancerígenos, por lo que es muy importante medir las concentraciones en las que se puede encontrar en el medio, lo anterior, debido a que metaboliza en Etilentiourea (ETU) (Domínguez *et al.*, 2009) igualmente responsable de los efectos embiotóxicos y de reproducción en ensayos de teratogenicidad en animales de laboratorio (Bayoumi *et al.*, 2001), además de presentar

daño citogenético elevado y variado en trabajadores expuestos al plaguicida (Hernández *et al.*, 2008).

Este trabajo de investigación propone un método analítico alternativo de bajo costo que permite conocer la concentración de Mancozeb disuelto en agua por medio de espectrometría Ultravioleta, por medio de un método confiable, económicamente viable y amigable con el ambiente, con el que se pueda verificar la calidad del agua para consumo humano, actividades agropecuarias y recreativas, que puede ser utilizado en cualquier muestra colectada de cuerpos de agua o fuentes aledañas a las zonas de cultivo, donde se fumiga con el plaguicida Mancozeb (pozos artesanales, ríos, lagunas, drenes, etc.) al utilizar este método, se podrá conocer la concentración del mismo de una forma confiable y práctica; por la sencillez y facilidad de aplicación del método, así como del bajo requerimiento instrumental, al llevarse a cabo mediante el uso de un espectrofotómetro Ultravioleta convencional.

La importancia de validar los métodos de ensayo y de calibración radica principalmente en proporcionar un alto grado de confianza, que permite una mejor toma de decisiones, por medio de los resultados obtenidos, por tal motivo, es de suma importancia optar por laboratorios con métodos analíticos validados.

3. MARCO TEÓRICO.

3.1. Normas y guías existentes.

Para el cumplimiento de las buenas prácticas de laboratorio, la validación es un requisito imprescindible que está establecido por agencias regulatorias a nivel internacional, como ISO (International Organization for Standardization), IEC (International Electrotechnical Commission), organismos internacionales de normalización las cuales formulan normas que permiten establecer la validación de los métodos analíticos, algunas de ellas son: la Norma ISO/IEC 17025:2005 “General requirements for the competence of testing and calibration laboratories”, o su nombre en español “Requisitos generales para la competencia de laboratorios de ensayo y calibración, la cual aplica para cualquier tipo de laboratorio de calibración o ensayos (pruebas), independiente de su tamaño o actividad y se integra por

una serie de requisitos agrupados en 25 secciones. Las primeras 15 secciones corresponden a los requisitos relativos a la gestión, que se caracterizan por su gran similitud con normas de la serie ISO 9000, el resto de las secciones contienen los requisitos que el laboratorio debe cumplir para demostrar su competencia técnica y asegurar la validez de sus resultados, establece una serie de requisitos que deben cumplir las entidades que realicen ensayos o calibraciones, incluyendo el muestreo. Abarca ensayos realizados por métodos normalizados, no normalizados y desarrollados por los laboratorios, aplica a todos los laboratorios que realicen ensayos para otras organizaciones, particulares o su propia organización (EURACHEM, 2005).

En México, la NMX-EC-17025-IMNC-2006 “Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración”, existe como normatividad regulatoria para el desarrollo de la validación de un método de medición y se establece para el aseguramiento de ciertos niveles de calidad de los laboratorios de ensayo y de calibración.

Existen otros documentos para el desarrollo de la validación de métodos, para el caso particular de este trabajo se tomó como referencia la Guía EURACHEM “Métodos Analíticos Adecuados a su Propósito: Guía de Laboratorio para la Validación de Métodos y Temas Relacionados” segunda edición 2005, traducción realizada por el CENAM de la obra original en inglés “The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics”, publicada en 1998 con el propósito de apoyar el trabajo de los laboratorios de ensayo y al público en general interesado en la validación de métodos.

3.2. Métodos analíticos existentes para la detección de Carbamatos.

Los métodos analíticos para la detección de Ditiocarbamatos en alimentos se clasifican en 3 grupos diferentes, dependiendo de la estructura química del analito, siendo los Dimetilditiocarbamatos, Etilenbisditiocarbamatos y Propilenbisditiocarbamatos. Ferbam, Thiram y Ziram provienen de los Dimetilditiocarbamatos, Mancozeb, Maneb, Metiram, Nabam y Zineb provienen de los Etilenbisditiocarbamatos y Propineb del Propilenbisditiocarbamatos, donde las muestras son descompuestas en un medio alcalino.

seguido de metilación y analizado por HPLC (FAO, 2007). Existen otros métodos propuestos para la detección de Carbamatos los cuales se muestran en el cuadro 1.

Cuadro 1. Métodos existentes para la determinación de Carbamatos.

AUTOR	MÉTODO	EQUIPO
EPA, 1982	Método 632 HPLC con detector Ultravioleta para la determinación de Carbamatos y pesticidas de urea en vertidos industriales y municipales.	Cromatógrafo HPLC y detector Ultravioleta, capaz de supervisar en 254 nm y 280 nm
FAO, 2007.	Método analítico para la detección de Ditiocarbamatos en comida HPLC.	Instrumento: HPLC (Agilent 1100 serie) y Detector: UV 272 nm (Agilent G1314A VWD)
Domínguez, 2009.	Método analítico para la determinación de Etilentiourea (ETU) subproducto del Mancozeb en un Andisol del Oriente Antioqueño	Cromatógrafo líquido de alta resolución
Domínguez et al., (2015).	Eco-friendly Spectrophotometric Method as Alternative for Carbon Disulfide-free Determination of Ethylenethiourea in Surface Water	Spectrophotometric with UV-Vis range, Genesys 6 model, Thermo Spetronic brand. Spectrophotometer Perkin-Elmer B050-7805 model UV.

3.3. Fundamento de la técnica instrumental.

La metodología que se utilizó para el desarrollo del método analítico propuesto deriva de los principios de la ley de Lambert-Beer, así como del análisis de datos en base a la aplicación de métodos matemáticos y estadísticos utilizados en quimiometría para identificar las condiciones analíticas para la detección del analito (longitud de onda a la cual se absorbe) y la estandarización del método analítico por medio de una validación interna e intermedia del mismo propuesta por EURACHEM en 2005.

La espectroscopia es una herramienta poderosa y útil para el análisis cuantitativo de muchos tipos de componentes al absorber radiación directamente en las regiones Ultravioleta y Visible proporcionando información sobre moléculas orgánicas, inorgánicas y bioquímicas. Cuenta con algunas características particulares como son: sensibilidad razonable, límites de detección relativamente altos, selectividad de moderada a alta,

exactitud y precisión razonables, así como rapidez y conveniencia, además, los métodos espectrofotométricos se pueden automatizar fácilmente (Skoog *et al.*, 2001).

3.3.1. Ley de Lambert-Beer.

Skoog *et al.*, 2001, mencionan que cada especie molecular tiene la capacidad de absorber su propia frecuencia característica de la radiación electromagnética. Este proceso transfiere energía a la molécula y provoca una disminución en la intensidad de radiación electromagnética incidente. Esta absorción de radiación atenúa el rayo incidente de acuerdo con la Ley de Absorción o de Lambert- Beer, la cual menciona que se puede obtener información cuantitativa de como la atenuación de la radiación (P) depende de la concentración de las moléculas que la absorben (c) y de la distancia que recorre el rayo en el medio absorbente (b) cuando la luz atraviesa una solución del analito (P_0), la intensidad de la radiación disminuye como consecuencia de la excitación del analito como se muestra en la figura 1.

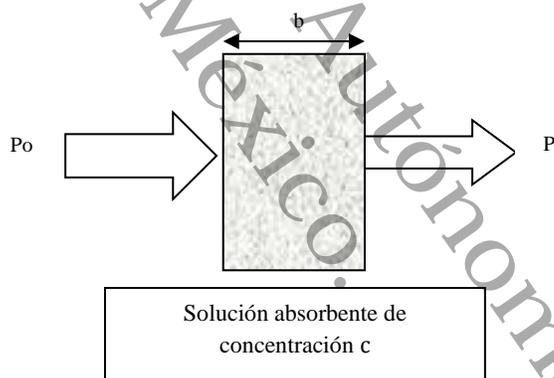


Figura 1. Atenuación de un haz de radiación por una solución absorbente.

La transmitancia T de la solución, es la fracción de radiación incidente que transmite la solución y suele expresarse como porcentaje de transmitancia como se muestra a continuación:

$$T = \frac{P}{P_0}$$

La absorbancia A de una solución está relacionada con la transmitancia en forma logarítmica como se muestra en la siguiente ecuación:

$$A = -\log T = \log \frac{P_0}{P}$$

La absorbancia está relacionada linealmente con la concentración (c) de las especies absorbentes y con la longitud de la trayectoria de la radiación (b) en el medio absorbente y se expresa mediante la siguiente ecuación:

$$A = \log \frac{P_0}{P} = abc$$

Donde a es una constante de proporcionalidad llamada absorptividad. La absorbancia es una cantidad adimensional, por tal motivo la absorptividad debe tener unidades que cancelen a las unidades b y c. Cuando la concentración se expresa en moles por litro y b en centímetros, la constante de proporcionalidad se denomina absorptividad molar y se representa con el símbolo ϵ . Por tanto:

$$A = \epsilon bc$$

Donde ϵ tiene unidades de litros por mol centímetro ($\text{Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Esta Ley tiene diversas aplicaciones, con ella se puede calcular la absorptividad molar de las especies si se conocen sus concentraciones, también se utiliza el valor de la absorbancia medida para conocer la concentración, si es que se conoce la absorptividad y la longitud de la trayectoria de la radiación. Para conocer la absorptividad en las condiciones del análisis se preparan varias soluciones patrón del analito en el mismo disolvente y a la misma temperatura. Con estas soluciones se construye la curva de calibración de absorbancia frente a la concentración o mediante una ecuación de regresión lineal.

3.3.2. Espectroscopia de absorción en el ultravioleta.

Los métodos de análisis que se basan en la medición de luz y otras formas de radiación electromagnética son los que más se utilizan en química analítica, la espectroscopia es una ciencia que estudia las interacciones que suceden en la radiación y la materia. Sus métodos de análisis miden la cantidad de radiación producida o absorbida, por las especies atómicas o moleculares que se analizan, clasificándose de acuerdo con la región del espectro electromagnético para hacer la medición (Skoog *et al.*, 2001).

La espectroscopia ultravioleta (UV), detecta las transiciones electrónicas de los sistemas conjugados y ofrece información acerca de la longitud y estructura de la parte conjugada de una molécula. Las frecuencias ultravioletas corresponden a longitudes de onda más cortas y a energías mucho más altas que las infrarrojas entre 200 a 400 nm., dichas longitudes están dadas en unidades de nanómetros (nm: 10^{-9} m.) Los espectrofotómetros UV comunes operan en el intervalo de 200 a 400 nm (2×10^{-5} a 4×10^{-5} cm.), que corresponde a las energías de fotones de alrededor de 300 a 600 kJ/mol (70 a 140 kcal/mol), los cuales con frecuencia se extienden a la región visible (mayor longitud de onda, menor energía) y se les llaman espectrofotómetros UV-visibles. Las energías UV-visibles corresponden a las transiciones electrónicas: la energía necesaria para excitar un electrón de un orbital molecular a otro (Wade, 2011).

3.3.3. Características de un espectrofotómetro.

Los métodos espectroscópicos ópticos se fundamentan en 6 fenómenos:

1. Absorción
2. Fluorescencia
3. Fosforescencia
4. Dispersión
5. Emisión
6. Quimioluminiscencia

Para realizar la medición de cada fenómeno la mayoría de los componentes básicos de los instrumentos son muy parecidos, aunque difieren algo en su configuración, las propiedades necesarias de estos componentes son las mismas independientemente de si se aplican a la región ultravioleta, visible o infrarroja del espectro.

Los instrumentos espectroscópicos característicos incluyen cinco componentes:

1. Fuente estable de energía radiante
2. Recipiente transparente para contener la muestra
3. Dispositivo que aisle una región restringida del espectro para la medida

4. Detector de radiación, que convierta la energía radiante en una señal utilizable (eléctrica)
5. Sistema de procesamiento y lectura de la señal, que visualice la señal detectada en una escala de medida, en una pantalla de osciloscopio, en un medidor digital o en un registrador (Skoog *et al.*, 2001).

3.3.4. Obtención de un espectro ultravioleta.

Para medir el espectro ultravioleta (o UV-visible) de un compuesto, se disuelve la muestra en un disolvente que no absorba sobre 200 nm. La disolución de la muestra se coloca en una celda de cuarzo, parte del disolvente se coloca en una celda de referencia. Un espectrofotómetro ultravioleta opera comparando la cantidad de luz transmitida a través de la muestra (el haz de la muestra) con la cantidad de luz en el haz de referencia. El haz de referencia pasa a través de la celda de referencia para compensar cualquier absorción de luz por la celda y el disolvente, el espectrofotómetro tiene una fuente que emite todas las frecuencias de la luz UV (arriba de 200 nm), esta luz pasa a través de un monocromador, el cual utiliza una rejilla o prisma de difracción para dispersar la luz en un espectro y seleccionar una longitud de onda, esta luz de una sola longitud de onda se separa en dos haces, con un haz que pasa a través de la celda de la muestra y otro que pasa a través de la celda de referencia (disolvente). El detector mide de manera continua la relación de la intensidad del haz de referencia (I_r) comparada con la del haz de la muestra (I_m). Como el espectrofotómetro escanea las longitudes de onda en la región UV, una impresora dibuja una gráfica llamada espectro de la absorbancia de la muestra como una función de la longitud de onda, semejante al que se muestra en la figura 2 (Wade, 2011).

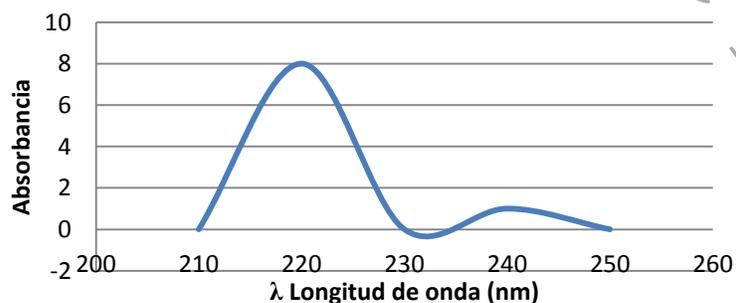


Figura 2. Gráfico de espectro de absorción.

3.3.5. Aplicaciones.

Los espectros de absorción se emplean para identificar más fácilmente un compuesto o identificar su identidad (Skoog *et al.*, 2001). El coeficiente de extinción molar ϵ , asociado con una longitud de onda de máxima absorbancia $\lambda_{\text{máx}}$, es muy útil para determinar las concentraciones de los fármacos (Wade, 2011).

3.4. Validación de métodos analíticos.

La validación de métodos analíticos es un requisito importante en la buena práctica del análisis químico, pero para algunos analistas la validación de métodos es algo que solo puede hacerse en colaboración con otros laboratorios y por tal motivo no la realizan (EURACHEM, 2005); La validación consiste en la confirmación mediante examen y el aporte de evidencias objetivas de que cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto, es decir; comprobar que una actividad es apta para el fin hacia el que va orientada (NMX-EC-17025-IMNC-2006).

EURACHEM interpreta la definición ISO de validación de un método como el proceso de definir una necesidad analítica y confirmar que el método en cuestión tiene capacidades de desempeño consistentes con las que requiere la aplicación, además menciona que es importante determinar el resultado correcto y demostrar que lo es, debido a que si el resultado de una prueba no es confiable y tiene poco valor esta no debe realizarse, la validación del método permite demostrar que el método es adecuado para su propósito por lo cual debe ser lo suficientemente confiable para que cualquier decisión basada en éste pueda tomarse con confianza. Frente a un problema analítico particular se inicia el proceso de desarrollo y evaluación continua hasta que se estime que el método es capaz de cumplir con su propósito, como se muestra en la figura 3.

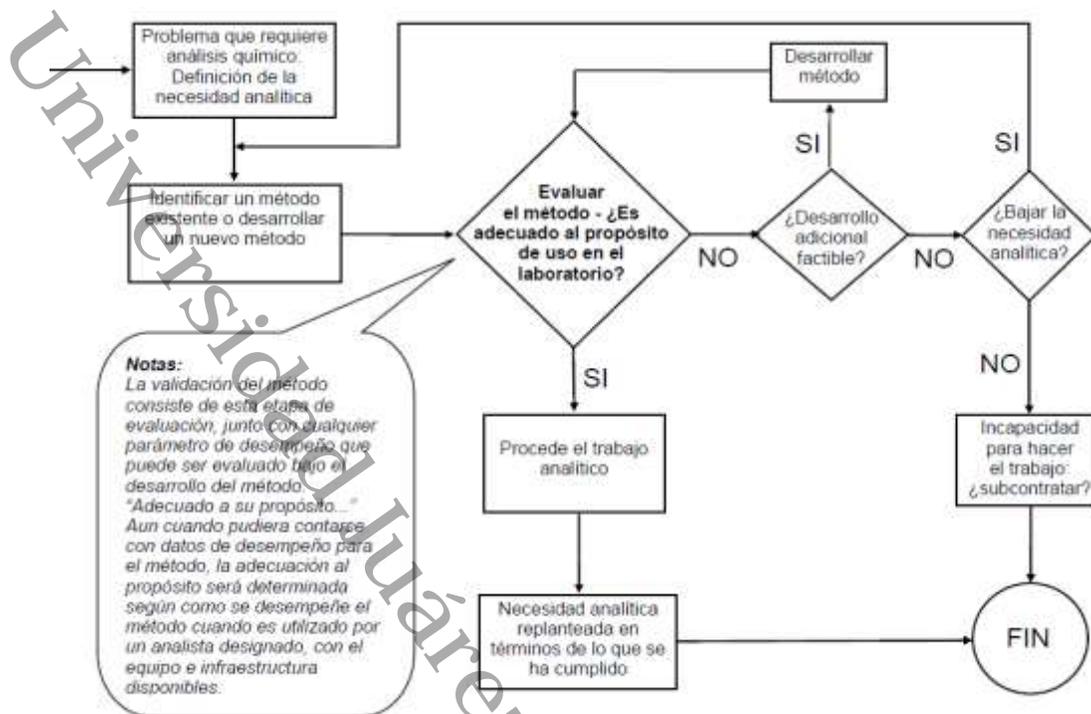


Figura 3. Proceso de evaluación del criterio de desempeño y confirmación de método (EURACHEM, 2005).

3.4.1. Parámetros de desempeño para validación interna del método.

Los resultados obtenidos en el proceso de validación analítica, deben poseer valores elevados en los parámetros de calidad, los cuales son: identidad del analito, límite de detección y de cuantificación, linealidad y exactitud, que permitan apreciarla como igual, mejor o peor que las restantes de su especie (EURACHEM, 2005). En este proceso, la estadística es una herramienta fundamental para la extracción de información química (Miller, 2002).

La validación de los métodos para los ensayos que involucren mediciones analíticas debe realizarse de acuerdo a los siguientes parámetros de desempeño del mismo, los cuales están descritos en la guía EURACHEM como se detallan a continuación:

3.4.1.1. Confirmación de la identidad del analito.

Es la capacidad de un método para determinar exacta y específicamente el analito de interés en una matriz de muestra bajo las condiciones de prueba establecidas (EURACHEM, 2005).

La selectividad analítica se relaciona con el grado en el que un método puede ser utilizado para determinar analitos particulares en mezclas o matrices sin interferencias de otros componentes de comportamiento similar. En espectroscopia, la identificación de compuestos desconocidos puede realizarse comparando la señal de absorbancia (es decir “picos”) en el espectro del analito con espectros de referencia (Eurolab, 2016).

3.4.1.2. Linealidad.

Es el intervalo de concentraciones o valores de la propiedad relacionada de las disoluciones medidas realmente, donde puede existir un intervalo de respuesta lineal, por lo tanto la señal de respuesta tendrá una relación lineal con la concentración del analito (EURACHEM, 2005).

Donde el extremo inferior está determinado por el límite de cuantificación LoQ y el superior por las concentraciones a las cuales se observan anomalías significativas en la sensibilidad analítica. El intervalo de trabajo del instrumento está definido en términos de la concentración de una muestra de ensayo procesada y presentada al instrumento para su medición, dichas mediciones representan la señal del instrumento en función de las concentraciones de los patrones de calibración, donde se grafica la concentración medida en función de las concentraciones conocidas de la muestra de ensayo, la respuesta de éste sigue una relación conocida, por ejemplo, lineal, curvilínea, etc. Durante la validación, es necesario confirmar esta relación, demostrar que el intervalo de trabajo del instrumento es compatible con el rango indicado en el alcance del método, y se debe de verificar que el procedimiento de calibración instrumental propuesto sea adecuado. Para evaluar el intervalo de trabajo del instrumento y confirmar su aptitud para el uso, se deberían estudiar patrones de calibración con un alcance de concentración que sobrepase el rango de concentración esperado en $\pm 10\%$ o incluso $\pm 20\%$ y graficar las señales para un rango de 1 a 100 mg/L⁻¹, $\pm 20\%$ indica de 0,8 a 120 mg/L⁻¹ se deben espaciar uniformemente las

concentraciones seleccionadas en el rango. La evaluación inicial del intervalo de trabajo se realiza mediante una inspección visual de la curva de respuesta, para proceder a confirmar la relación entre la concentración y la respuesta del instrumento revisando las estadísticas de regresión y el gráfico de residuales del modelo elegido (por ejemplo, lineal, cuadrático) A partir de la curva de respuesta y las estadísticas de apoyo obtenidas en el intervalo de trabajo del instrumento, el analista puede evaluar si el procedimiento de calibración propuesto indicado en el método es apropiado (Eurolab, 2016).

3.4.1.3. Límite de detección (LoD).

El Límite de detección (LoD) es la concentración más baja del analito o el valor de su propiedad relacionada, que puede detectarse confiablemente por el método. La ISO/IEC 17025-1999 utiliza como un término general “valor mínimo detectable de la variable de estado definida” el cual en química se traduce como la “concentración neta mínima detectable” (EURACHEM, 2005). Para los propósitos de validación de métodos, es suficiente proporcionar un indicativo del nivel al cual la detección resulta problemática, para este propósito usualmente se considera la aproximación “blanco + 3s”. Para obtener el LoD debe basarse en el análisis de muestras que hayan sido sometidas a todo el proceso de medición obteniendo resultados calculados con la misma ecuación que para las muestras de ensayo expresándolo de la siguiente forma:

$$X_{LoD} = \bar{X}(B) + 10s(B)$$

Dónde:

$\bar{X}(B)$: es el promedio de las mediciones de los blancos.

$s(B)$: es la desviación estándar de las mediciones de los blancos.

3.4.1.4. Límite de cuantificación (LoQ).

El Límite de Cuantificación (LoQ) es la concentración más baja del analito que puede ser determinada con un nivel aceptable de precisión de repetibilidad y veracidad, el cual puede ser estimado como la concentración del analito que corresponde al promedio de los valores de los blancos de la muestra + k (5, 6 o 10) desviaciones estándar, se expresa de la siguiente forma: (EURACHEM, 2005).

$$X_{LoQ} = \bar{X}(B) + 5s(B)$$

Dónde:

$\bar{X}(B)$: es el promedio de las mediciones de los blancos.

$s(B)$: es la desviación estándar de las mediciones de los blancos.

3.4.1.5. Porcentaje de recuperación.

La fracción de analito adicionada a una muestra de prueba (muestra fortificada o adicionada) previa al análisis que es determinada efectivamente por el método; el porcentaje de recuperación (%R) entre las muestras fortificadas y sin fortificar se calcula como se muestra a continuación:

$$\%R = [(CF-CU)/CA] \times 100$$

Dónde:

CF es la concentración de analito medida en la muestra fortificada;

CU es la concentración de analito medida en la muestra sin fortificar;

CA es la concentración del analito adicionado (valor medido, no determinado por el método) en la muestra fortificada (EURACHEM, 2005).

3.4.2. Validación del modelo de calibración.

3.4.2.1. Validación cruzada.

La validación cruzada es una técnica estadística la cual se utiliza para estimar el error de predicción asociado al ajuste de un método en particular, consiste en dividir aleatoriamente el conjunto de observaciones en dos partes: en el conjunto de entrenamiento y el conjunto de validación, el modelo es ajustado en el conjunto de entrenamiento y se utiliza para predecir las respuestas a las observaciones en el conjunto de validación, la tasa de error resultante para el conjunto de validación (Payam, 2008).

3.5. Plaguicidas.

El Código Internacional de Conducta Sobre la Distribución y Utilización de Plaguicidas de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) adoptado por el 123° período de sesiones del Consejo de la FAO en noviembre del 2002, establece que plaguicida es cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo los vectores de enfermedades humanas o de los animales, las especies de plantas o animales indeseables que causan perjuicio o que interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera y productos de madera o alimentos para animales, o que pueden administrarse a los animales para combatir insectos, arácnidos u otras plagas en o sobre sus cuerpos. El término incluye las sustancias destinadas a utilizarse como reguladoras del crecimiento de las plantas, defoliantes, desecantes, agentes para reducir la densidad de fruta o agentes para evitar la caída prematura de la fruta y las sustancias aplicadas a los cultivos antes o después de la cosecha para proteger el producto contra la deterioración durante el almacenamiento y transporte (FAO, 2002).

3.5.1. Clasificación de los plaguicidas.

Existen numerosos tipos de plaguicidas, los cuales pueden ser clasificados de distintas maneras, en el cuadro 2 se muestra la clasificación de acuerdo a los organismos que controlan como se muestra a continuación:

Cuadro 2. Clasificación de los plaguicidas por organismos que controlan (OMS, 2004).

Nombre	Controlan
Insecticidas	Insectos
Herbicidas	Maleza
Fungicidas	Hongos y moho
Rodenticidas	Roedores
Molusquicidas	Moluscos

A continuación en el cuadro 3 se presenta la clasificación con respecto a la composición química que presentan:

Cuadro 3. Clasificación de los plaguicidas por su composición química (OMS, 2004).

Insecticidas	Herbicidas	Fungicidas	Rodenticidas
Organofosfatos	Compuestos clorofenilicos	Bencenos sustituidos	Inorgánicos
Carbamatos	Pentaclorofenol	Tiocarbamatos	Cumarinas / indandionas
Organoclorados	Compuestos nitrofenólicos y nitrocresólicos	Etileno Bis ditiocarbamato	Convulsivos
Piretrinas y Piretroides	Paraquat, Dicuat	Tioftalimidas	Colecalciferol
Compuestos arsenicales y otros compuestos.	Compuestos arsenicales y otros compuestos.	Compuestos organometálicos	

3.5.2. Clasificación toxicológica de los plaguicidas.

La clasificación toxicológica de los plaguicidas según el riesgo, es respecto a la toxicidad que presentan, esta es según su grado de peligrosidad, con base en la dosis letal media (DL₅₀) de producto formulado, sólido o líquido en ratas expuestas por vía oral o cutánea, es decir la dosis que mata a la mitad en promedio de la población expuesta, como se muestra en el cuadro 4 (OMS, 2004).

Cuadro 4. Clasificación toxicológica de los plaguicidas por su riesgo (OMS, 2004).

Clasificación	DL₅₀ aguda mg/kg de plaguicida formulado			
	Por vía oral		Por vía cutánea	
	Sólidos	Líquidos	Sólidos	Líquidos
I A Sumamente peligroso	5 o menos	20 o menos	10 o menos	40 o menos
I B Muy peligroso	Más de 5 hasta 50	Más de 20 hasta 200	Más de 10 hasta 100	Más de 40 hasta 400
II Moderadamente peligroso	Más de 50 hasta 500	Más de 200 hasta 2.000	Más de 100 hasta 1.000	Más de 400 hasta 4.000
III Poco peligroso	Más de 500 hasta 2.000	Más de 2.000 hasta 3.000	Más de 1.000	Más de 4.000
IV Productos que normalmente no ofrecen peligro	Más de 2.000	Más de 3.000		

3.6. Mancozeb (Etilenbisditiocarbamato de Manganeso).

Mancozeb fue registrado en los Estados Unidos en 1948 como un fungicida de amplio espectro usado en agricultura, manejo profesional de césped y horticultura, es un miembro del Etileno Bisditiocarbamato (EBDC) grupo de fungicidas, que incluye los activos relacionados con Maneb y Metiram. Los EBDCs degradan en Ethylenethiourea (ETU) la Agencia sugiere que los EBDC's y ETU pueden presentar posibles riesgos para la salud humana y el medio ambiente. En 1982, la Agencia concluyó una revisión especial mediante la emisión de una determinación Final (PD 4) con las medidas necesarias para la reducción del riesgo, a fin de prevenir efectos desfavorables. En 1987, la EPA emitió un segundo aviso de iniciación de revisión especial de los plaguicidas EBDC, debido a problemas de salud causada por ETU, incluyendo el potencial carcinogénico, efectos del desarrollo y de la tiroides. Los riesgos a la salud que se presentan es similar a otros EBDC's y ETU, en varios estudios se observaron efectos en la tiroides, esta toxicidad se manifiesta como alteraciones de la hormona tiroidea, aumento de peso y lesiones microscópicas de la misma (principalmente hiperplasia de las células foliculares de la tiroides) y tumores de la tiroides (EPA, 2005).

3.6.1. Propiedades físicas y químicas de Mancozeb.

Mancozeb cuenta con las siguientes propiedades físicas y químicas:

Cuadro 5. Propiedades físicas y químicas de Mancozeb (Manual Técnico HELM, 2012).

Nombre químico	Etilenbis-ditiocarbamato de Zinc y Manganeso
No. CAS	8018-01-7
Fórmula empírica:	$(C_4 H_6 Mn N_2 S_4)_x (Zn)_y$
Peso molecular	$(265.3) x + (65.4) y$
Densidad	1.92
Estado físico	Sólido (Polvo)
Color	Amarillo grisáceo, pardo amarillento.
Olor	Característico, ligero azufre.
Tensión de vapor a 20° C:	$< 0.0075 \times 10^{-3}$ mm Hg.
Solubilidad en agua	6- 20 mg/L
Estabilidad	Estable en condiciones normales de almacenamiento.

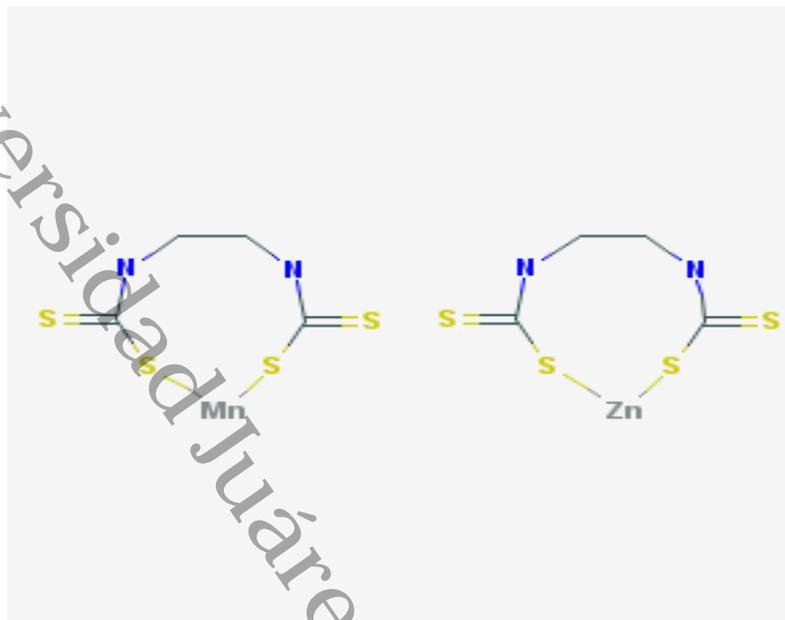


Figura 4. Fórmula estructural del Mancozeb (National Center for Biotechnology Information, 2017).

3.6.2 Modo y mecanismo de acción de Mancozeb.

El modo de acción de Mancozeb para ejercer su efecto en los hongos reportado en el Manual Técnico Cyrizate es vía sistémica, su mayor efecto lo logra al ser aplicado de manera preventiva, debido a que afecta múltiples procesos metabólicos de los hongos e impide la actividad de las enzimas sulfhídricas y de la cisteína, causa una disrupción de la actividad respiratoria e irrumpe el ciclo de Krebs y la formación de ATP. Los procesos que afecta Mancozeb son regulados por varios genes, lo que hace necesario que sucedan múltiples mutaciones para desarrollar a un individuo resistente, por lo anterior se considera que la aparición de resistencia de los hongos a este fungicida es difícil que se exprese (Manual Técnico HELM, 2012).

3.6.3 Espectro de acción de Mancozeb.

Mancozeb posee un amplio espectro de acción y manifiesta significativos efectos de control sobre diversos grupos de hongos que dañan a los cultivos los cuales se mencionan en el cuadro 6 (Manual Técnico HELM, 2012).

Cuadro 6. Espectro de acción de Mancozeb (Manual Técnico HELM, 2012).

Nombre Común	Nombre Científico
Mancha de la hoja	<i>Alternaria cucumerina</i>
Tizón foliar	<i>Alternaria dauci</i>
Mancha púrpura	<i>Alternaria porri</i>
Tizón temprano	<i>Alternaria solani</i>
Pudrición del cuello	<i>Botrytis allii</i>
Moho gris	<i>Botrytis cinérea</i>
Mildiu	<i>Bremia lactucae</i>
Mancha foliar	<i>Cercospora apii</i>
Mancha de la hoja	<i>Cercospora capsici</i>
Chamusco	<i>Cercospora musae</i>
Mancha lineal	<i>Cercospora oryzae</i>
Antracnosis	<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>
Antracnosis	<i>Colletotrichum lagenarium</i>
Antracnosis	<i>Colletotrichum gloesporoides</i>
Tiro de munición	<i>Coryneum beijerinckii</i>
Melanosis	<i>Diaporthe citri</i>
Sarna	<i>Elsinoe fawcettii</i>
Pudrición amarga	<i>Glomerella cingulata</i>
Mancha común	<i>Helminthosporium sativum</i>
Mancha de la hoja	<i>Helminthosporium oryzae</i>
Tizón de la hoja	<i>Helminthosporium maydis</i>
Mancha reticular	<i>Helminthosporium teres</i>
Sigatoka negra	<i>Mycosphaerella jiensis</i> var. <i>Difformis</i>
Mildiu	<i>Peronospora destructor</i>
Marchitez	<i>Phytophthora capsici</i>
Pudrición del fruto	<i>Phytophthora palmivora</i>
Tizón tardío	<i>Phytophthora infestans</i>
Roya	<i>Puccinia striiformis</i>
Roya del tallo	<i>Puccinia graminis fsp tritici</i>
Pudrición del tallo	<i>Rhizoctonia solani</i>
Mancha de la hoja	<i>Septoria dianthi</i>
Mancha gris de la hoja	<i>Stemphylium solani</i>
Carbón apestoso	<i>Tilletia caries</i>
Sarna	<i>Venturia inaequalis</i>
Verrucosis	<i>Taphrina deformans</i>

3.6.4. Manejo de la resistencia y clasificación FRAC.

El ingrediente activo Mancozeb ha sido clasificado por el Comité de Acción de la Resistencia de los Fungicidas (FRAC, por sus siglas en inglés) con el código M3, esta clasificación permite establecer programas de rotación de diferentes ingredientes activos para su manejo efectivo y sustentable que retrasen o limiten la manifestación de la resistencia (Manual Técnico HELM, 2012), como se muestra a continuación:

Modo de acción	⇒	Multisitio – actividad de contacto
Sitio de acción	⇒	Multisitio – actividad de contacto
Grupo	⇒	Ditiocarbamatos y relativos
Grupo químico	⇒	Ditiocarbamatos y relativos
Nombre común	⇒	Mancozeb
Riesgo de resistencia:	⇒	Bajo. Sin ningún signo de resistencia desarrollado
Código FRAC	⇒	M3

3.6.5. Efectos toxicológicos del Mancozeb.

Mancozeb es un fungicida con categoría de clasificación IV Banda toxicológica verde, en el cuadro 7 se informa sobre su toxicología (Manual Técnico HELM, 2012).

Cuadro 7. Información toxicológica de Mancozeb (Manual Técnico HELM, 2012).

Toxicidad	DL ₅₀	Especie
Toxicidad oral aguda	>2000 mg/kg	Rata
Toxicidad dérmica aguda	>1000 mg/kg	Rata
	CL ₅₀	
Toxicidad aguda inhalatoria	>2.58 mg /L	Rata

Así mismo, se muestra los efectos irritantes cáusticos en el siguiente cuadro 8 y en el cuadro 9, los efectos tras exposición repetida o prolongada (subcrónico, crónico):

Cuadro 8. Efectos irritantes cáusticos de Mancozeb (Manual Técnico HELM, 2012).

Prueba	Resultado	Especie
Irritación cutánea	Irritación por contacto prolongado	Conejo
Irritación ocular	Ligeramente irritante	Conejo
Sensibilización	El producto es sensibilizante	Conejo

Cuadro 9. Efectos por exposición prolongada a Mancozeb (Manual Técnico HELM, 2012).

Prueba	Especie	Comentario
Mutagenicidad	<i>Salmonella typhimurium</i>	Mutagénico
Teratogenicidad	Rata	No teratogénico
Toxicidad para la reproducción	Rata	Los resultados no indican efectos en la reproducción

Los trabajadores con exposición ocupacional al Mancozeb pueden desarrollar erupciones cutáneas. Mancozeb es un inhibidor de la enzima colinesterasa, presentándose algunos primeros síntomas como son visión borrosa, fatiga, dolor de cabeza, vértigo, náusea, pupilas dilatadas, cólicos y diarrea. Una severa inhibición de la enzima colinesterasa puede causar sudoración excesiva, latido lento, mareo, balbuceos, confusión, exceso de fluidos en pulmones, convulsiones y el coma. Una toxicología grave se debe a una exposición crónica de Etilentiourea (ETU), la cual se produce cuando los EBDC's son utilizados, almacenados o en su preparación. Además, tiene el potencial de causar bocio, una condición causada cuando la glándula tiroidea se agranda, este metabolito produce defectos congénitos y cáncer en experimentos en animales (Kamrin et al, 1999).

3.6.6. Evaluación del riesgo ambiental por uso de Mancozeb.

La evaluación del riesgo ambiental de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de Norteamérica (EPA) compara la toxicidad de un plaguicida en especies representativas con las concentraciones ambientales estimadas (EECs) que se calculan en base al destino ambiental y uso del plaguicida. Como parte del proceso, se calcula un cociente de riesgo (RQ) que resulta al dividir un EEC entre el valores de los criterios o factores decisivos (endpoints) más sensitivos evaluados, tales como una dosis letal media (LD₅₀) o una concentración letal media (LC₅₀). Por lo general, mientras más alto es el RQ, mayor es el nivel de riesgo, los valores de los RQs se comparan con los niveles de cuidado (LOCs), descritos en el cuadro 10, lo que indica si el plaguicida al aplicarse de acuerdo a las indicaciones de la etiqueta, tiene el potencial de causar efectos adversos a organismos no objetivos, cuando el valor del RQ excede el del LOC para una categoría en particular, se asume que existe un riesgo en esa categoría. Pueden ajustarse los valores de los RQs al

caracterizar la evaluación del riesgo de acuerdo al uso, toxicidad, destino, exposición, y los niveles de seguridad y duda en la evaluación original (EPA, 2005).

Cuadro 10. Niveles de Cuidado (LOCs) para riesgos ecotoxicológicos (EPA, 2005).

Si el RQ excede el valor LOC			
Organismos terrestres	Organismos acuáticos	Plantas	Presunción de riesgo
0.5	0.5	1	Riesgo agudo: Hay la posibilidad de que exista un riesgo agudo. Podría justificarse una acción regulatoria y establecerse una clasificación de uso restringido.
0.2	0.1	N/A	Riesgo agudo-Uso Restringido: Hay la posibilidad de que exista un riesgo agudo, el cual se puede mitigar a través de una clasificación de uso restringido.
0.1	0.05	1	Riesgo agudo para especies en peligro de extinción: Tales especies podrían ser afectadas adversamente, lo que podría justificar una acción regulatoria.
1	1	N/A	Riesgo Crónico: Hay la posibilidad de que se manifieste un riesgo crónico, lo que podría justificar una acción regulatoria.

3.6.7. Exposición de organismos acuáticos al Mancozeb.

Se considera que el agua superficial es la única fuente potencial para la exposición de los organismos acuáticos, para lo cual se usan modelos que estiman tal exposición, aunque Mancozeb es altamente susceptible a hidrólisis, es poco probable que se encuentre en sistemas acuáticos, lo cual no puede decirse lo mismo de su metabolito ETU. Debido a la falta de datos de monitoreo para cuerpos acuáticos menores, se usaron modelos exploratorios para estimar EECs de Mancozeb y sus metabolitos en agua de superficial, descrita en el siguiente cuadro (EPA, 2005).

Cuadro 11. Concentraciones ambientales estimadas (EECs) de Mancozeb en agua (EPA, 2005).

Cultivo	Tarifa de aplicación (lbs ai/A)	EECs de Mancozeb en agua superficial (mg/L)				
	Número de aplicaciones Intervalo de aplicación	Pico	96 horas promedio	21 días promedio	60 días promedio	Anual promedio
Manzana	4.8 4	0.073	0.022	0.007	0.003	0.0005
	7					
Maíz dulce	1.2 15	0.068	0.024	0.009	0.004	0.001
	4					
Papas	1.6 7	0.046	0.013	0.004	0.002	0.0005
	5					
Tomates	2.4 7	0.210	0.056	0.016	0.007	0.001
	7					
Trigo	1.6 3	0.103	0.029	0.007	0.003	0.0006
	7					

Los valores de EEC usados para evaluar la exposición de los animales acuáticos se diferencian de los valores utilizados para evaluar la exposición humana de agua potable. A diferencia de la evaluación del agua potable, la evaluación de los recursos ecológicos de la fuente de agua no incluye el índice del depósito y el porcentaje del factor de área de cultivo. El índice del depósito y el porcentaje del factor de área de cultivo representan un reservorio de agua potable, no la variedad de hábitats acuáticos, tales como los estanques adyacentes a campos tratados, relevantes para una evaluación del riesgo para los animales acuáticos.

Además, la evaluación del agua potable se basa en el ETU (producto de la degradación de Mancozeb), considerando que la evaluación del riesgo acuático está basada sobre el modelado BECs para Mancozeb. (EPA, 2005).

3.6.8. Toxicidad aguda en organismos acuáticos por exposición a Mancozeb

Mancozeb es considerado como un plaguicida con una alta toxicidad aguda para peces e invertebrados acuáticos. Los invertebrados estuarinos y marinos son los más sensitivos, con una concentración ambiental (EC₅₀) de 0.0105 mg/L. La toxicidad aguda de Mancozeb para los organismos acuáticos se resume en el cuadro 12 (EPA, 2005).

Cuadro 12. Toxicidad aguda de Mancozeb para los organismos acuáticos (EPA, 2005).

Organismo	Especie	% a.i.	Valores de los criterios o factores decisivos	Categoría de toxicidad	MRID No.
Agua dulce					
Peces	Rainbow trout, <i>Salmo gairdneri</i>	80	LC50 = 0.46 mg/L	Muy tóxico	40118502
Invertebrados	<i>Daphnia magna</i>	80	LC50 = 0.58 mg/L	Muy tóxico	40118503
Algas verdes	<i>Selenastrum capricornutum</i>	82.4	EC50 = 0.47 mg/L	No aplica	43664701
Estuarino / Marino					
Peces	Sheepshead minnow, <i>Cyprinodon variegatus</i>	82.4	LC50 = 1.60 mg/L	Moderadamente tóxico	41844901
Invertebrados	Mysid shrimp (<i>Americamysis bahia</i>)	82.4	EC50 = 0.01mg/L	Sumamente tóxico	41822901

3.6.9. Toxicidad crónica en organismos acuáticos por exposición a Mancozeb.

Se realizaron estudios de toxicidad crónica de Mancozeb para peces de agua dulce e invertebrados, pero no se ha realizado para especies de estuarios marinos. Existe una brecha de datos para estudios de toxicidad acuática crónica en peces e invertebrados de estuarios

marinos, los datos de toxicidad crónica para especies de agua dulce se resumen en el cuadro 13 (EPA, 2005).

Cuadro 13. Toxicidad crónica de Mancozeb para organismos de agua dulce (EPA, 2005).

Organismo	Especie estudiada	% a.i.	Indicador valores de los criterios o factores decisivos (endpoints)	MRID No
Peces en etapa temprana de vida etapa	<i>Pimephales promelas</i>	79.3	NOAEC = 0.002 mg/L	43230701
			LOAEC = 0.004 mg/L supervivencia y ausencia de efectos de crecimiento	
Invertebrados ciclo de vida	<i>Daphnia magna</i>	82.4	21-day NOAEC = 0.007 mg/L	40953802
			LOAEC = 0.012 mg/L inmovilidad, longitud y tiempo hasta la primera camada	

3.6.10. Riesgo para los organismos acuáticos por Mancozeb.

Para evaluar el riesgo de Mancozeb para los organismos acuáticos, La EPA seleccionó patrones representativos y modelado de las dosis de aplicación máxima y mínimas en intervalos entre aplicaciones. La Agencia modeló en cultivos de manzanas, papas, maíz dulce, tomate y trigo para representar el patrón de uso de Mancozeb. Los riesgos agudos RQs se predicen con el pico EECs para Mancozeb en aguas superficiales y los riesgos crónicos RQs se predicen utilizando 60 días de EECs. Los riesgos para los organismos acuáticos de agua dulce por Mancozeb se muestran en el cuadro 14 (EPA, 2005).

Cuadro 14. Riesgos para los organismos acuáticos de agua dulce por Mancozeb (EPA, 2005).

Cultivo / Método de aplicación	Tarifa de aplicación (lbs ai/A)	RQs agudo (picos EECs)			RQs crónico (60 días promedio EECs)	
	Número de aplicaciones	Peces	Daphnia	Algas	Peces	Daphnia
	Intervalo de aplicación (días)					
Manzana Tierra y aéreo	4.8 4	0.16	0.13	1.56	1.46	0.96
Maíz dulce Tierra y aéreo	7 1.2 15	0.15	0.12	1.45	2.05	1.32
Papas Tierra y aéreo	4 1.6 7	0.10	0.08	1.00	1.00	0.59
Tomate Tierra y aéreo	5 2.4 7	0.46	0.36	4.49	3.33	2.29
Trigo Tierra y aéreo	7 1.6 3 71	0.22	0.18	2.20	1.46	1.05

Los RQs para peces se basan en una LC_{50} de 0.46 mg/L para trucha arco iris y un NOAEC de 0.002 mg/L para carpa cabezona. Los RQs para daphnia se basan en un EC_{50} de 0.58 mg/L y un NOAEC de 0.007 mg/L para pulga de agua, *Daphnia magna*. Los RQs de algas se basan en un EC_{50} de 0.047mg/L para algas verdes, *Selenastrum capricornutum*.

Los riesgos agudos para los organismos acuáticos estuarinos / marinos por Mancozeb se muestran en el cuadro 15 (EPA, 2005).

Cuadro 15. Riesgos agudos para los organismos acuáticos estuarinos / marinos por Mancozeb (EPA, 2005)

Cultivo / Método de aplicación	Tarifa de aplicación (lbs ai/A) Número de aplicaciones Intervalo de aplicación (días)	RQs Agudo	
		Peces	Camarón misido
Manzanas	4.8		
Tierra y aéreo	4	0.05	6.99
	7		
Maíz dulce	1.2		
Tierra y aéreo	15	0.04	6.50
	4		
Papas	1.6		
Tierra y aéreo	7	0.03	4.46
	5		
Tomates	2.4		
Tierra y aéreo	7	0.13	20.08
	7		
Trigo	1.6		
Tierra y aéreo	3	0.06	9.85
	7		

La EPA reporta varios eventos de envenenamiento de fauna, asociados con Mancozeb, los cuales se detallan en el cuadro 16 (EPA, 2005).

Cuadro 16. Incidentes ecológicos por envenenamiento con Mancozeb (EPA, 2005).

Incidente	Plaguicida	Fecha	Efecto adverso	Magnitud del daño
B0000-501-42	Mancozeb y benomyl	Desconocido	Daño en plantación	No reportado
B0000-233	Mancozeb, sulfur y thiodan	7/1970	Mortandad de peces	Miles
I006382-002	Mancozeb y methomyl	9/1972	Mortandad de pájaros	Muertos: 35 Intoxicados: 31
I000799-008	Mancozeb, maneb, fenarimol y endosulfan	4/1992	Mortandad de peces	> 600 peces
I008745-004	Mancozeb	7/1995	Mortandad de peces	30,000 to 35,000 peces

3.6.11. Exposición al plaguicida Mancozeb por medio del agua potable.

La exposición a plaguicidas por medio del agua potable puede ocurrir por la contaminación de aguas superficiales y subterráneas. La EPA (Environmental Protection Agency) considera como aguda (un día) y crónica (de por vida) y utiliza aplicaciones para modelar o monitorear, si este último está disponible y es de suficiente calidad para estimar los riesgos a dicha exposición. La Agencia preparó una evaluación de la exposición por medio de agua potable sólo para ETU, no se evaluaron los fungicidas EBDC porque considerando que presentan una breve duración en suelo y agua, no se espera que llegue hasta el agua para consumo humano, ya sea de fuentes superficiales o subterráneas. ETU, sin embargo, es altamente soluble y moderadamente móvil y puede llegar a las aguas superficiales y subterráneas bajo ciertas condiciones. ETU tiene una vida media de suelo aeróbico de 3 días, el período de metabolismo aeróbico acuático fue asumido para ser de 6 días aproximadamente, el doble de la vida media en suelo, sin embargo, la vida media del metabolismo acuático anaeróbico medido es substancialmente más largo (149 días), que puede conducir a las detecciones periódicas en las aguas subterráneas. Las concentraciones estimadas de ETU en agua potable (EDWCs) se obtuvieron utilizando datos de monitoreo y modelación, en el cuadro 17 se muestra el EDWCs usados para evaluar la exposición a ETU en el agua potable de fuentes superficiales y subterránea. (EPA, 2005).

Cuadro 17. Concentraciones estimadas de ETU para agua potable (EPA, 2005).

Fuente de agua potable	Duración	EDWC (mg/L)	Fuente del dato
Agua superficial	Aguda	0.0250	Modelado
	Crónica	0.0001	Monitoreo
Agua subterránea	Toda la duración	0.0002	Monitoreo

3.6.12. Criterios de aplicación, manejo y seguridad de Mancozeb.

Durante la preparación y aplicación del producto, se debe hacer a favor del viento. No comer, beber o fumar durante el manejo y las aplicaciones. No destapar las boquillas con la boca. Al terminar las labores hay que descontaminar el equipo de aplicación, bañarse con abundante agua y jabón, usar ropa limpia. La ropa protectora contaminada deberá lavarse

por separado antes de volver a usarla. El personal que manipula y aplica el Mancozeb, debe de usar el equipo de protección personal adecuado: ropa protectora químicamente resistente a este material: overol, cubre todo o delantal, lentes (con protección lateral), botas, casco, mascarilla (Cartucho para vapor orgánico con un pre-filtro de partículas), guantes químicamente resistentes a este material, por ejemplo de materiales de barrera como el Cloruro de Polivinilo ("PVC" ó vinilo), Neopreno y Caucho de nitrilo/butadieno (Dow Agrosiences, 2015).



Figura 5. Equipo de protección personal para el manejo de Mancozeb.

4. HIPÓTESIS

Es posible conocer la concentración de Mancozeb (Etilenbisditiocarbamato de Zinc y Manganeso) disuelto en agua por medio de un método analítico de espectrometría ultravioleta, capaz de detectar concentraciones mayores a 1 mg/L de manera precisa.

5. OBJETIVOS

5.1. General.

Establecer y validar un método analítico por espectrometría ultravioleta que permita obtener la concentración de Mancozeb (Etilenbisditiocarbamato de Zinc y Manganeso) disuelto en agua.

5.2. Específicos.

- ✓ Identificar las condiciones analíticas para la confirmación de la identidad del analito a diferentes concentraciones (longitud de onda de mayor absorción).
- ✓ Determinar las características de desempeño asociadas a la validación interna del método (Límite de detección, Límite de Cuantificación, Linealidad y Porcentaje de Recuperación).
- ✓ Validar el modelo de calibración utilizando técnicas quimiométricas.

6. ÁREA DE ESTUDIO

Las áreas donde se aplicó el método validado es la zona platanera del Estado de Tabasco (ver figura 6), estas se localizan principalmente en el municipio de Teapa, Tabasco, entre los paralelos 17°28' y 17°47' de latitud norte; los meridianos 92°49' y 93°04' de longitud oeste; altitud entre 0 y 1 000 m., colinda al norte con los municipios de Centro y Jalapa; al este con los municipios de Jalapa y Tacotalpa; al sur y oeste con el Estado de Chiapas. Ocupa el 1.70% de la superficie del estado, cuenta con 59 localidades y una población total de 49,262 habitantes. Su fisiografía está conformada por la Provincia: la Llanura Costera del Golfo Sur (78.62%) y Sierras de Chiapas y Guatemala (21.38%), con Subprovincia: Llanuras y Pantanos Tabasqueños (78.62%) y Sierras del Norte de Chiapas (21.38%) y el Sistema de topofomas: Llanura aluvial (68.33%), Sierra alta escarpada compleja (21.38%) y Lomerío con llanuras (10.29%). El clima es cálido húmedo con un rango de temperatura entre los 24 – 26°C, con lluvias todo el año (100%) entre 2 000 – 4 500 mm. Su Geología es del Periodo Cuaternario (72.59%), Neógeno (13.90%), Cretácico (8.31%) y Paleógeno (5.01%). Compuesto principalmente por roca Ígnea extrusiva andesita (13.90%), sedimentaria Caliza (8.31%), lutita-arenisca (5.00%) y arenisca (0.01%). El suelo es aluvial (58.22%), lacustre (7.54%) y palustre (6.83%). Con suelo dominante: Gleysol (49.10%), Luvisol (41.65%), Acrisol (5.56%), Phaeozem (3.04%). Se ubica en la Región Hidrológica Grijalva - Usumacinta (100%), de la Cuenca R. Grijalva-Villahermosa (100%) y Subcuenca: R. de la Sierra (61.10%), R. Pichucalco (36.26%) y R. Tacotalpa (2.64%). Las corrientes de agua perennes son: Teapa, Puyacatengo, Saúz, Blanquillo, Jovo, Ogoiba, Majagual y Pichucalco. Los cuerpos de agua Intermitentes son: Guispal, Platanar, La Huasteca, San Antonio, San Nicolás. Perennes (0.20%): Sitio Grande. El principal uso del suelo es: Pastizal cultivado (51.43%), agricultura (25.62%), zona urbana (1.37%). La vegetación es: selva (15.16%) y tular (6.22%). El uso potencial de la tierra es agrícola: para la agricultura mecanizada continua (47.19%), para la agricultura mecanizada estacional (11.02%), para la agricultura de tracción animal continua (12.83%), para la agricultura de tracción animal estacional (0.43%), para la agricultura manual continua (0.31%), no aptas para la agricultura (28.22%). Pecuario: Para el establecimiento de praderas cultivadas con maquinaria agrícola (59.89%) para el establecimiento de praderas cultivadas con tracción

animal (11.15%), para el aprovechamiento de la vegetación natural diferente del pastizal (1.94%), no aptas para el uso pecuario (27.02%). (INEGI, 2008).

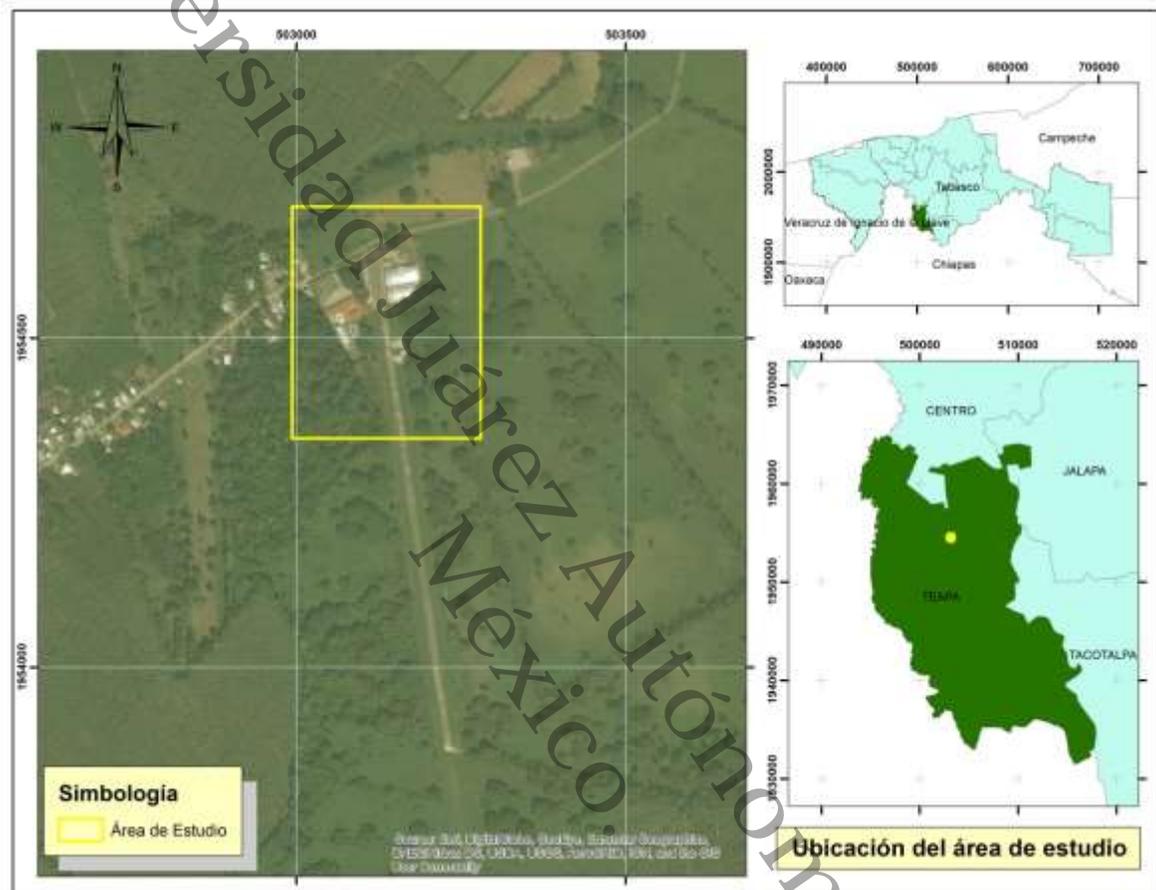


Figura 6. Mapa del área de estudio.

7. MÉTODO

7.1. Materiales y reactivos:

El estándar Mancozeb (Etilenbisditiocarbamato de Zinc y Manganeso) que se utilizó es de grado analítico, de la casa comercial Sigma-Aldrich lote # SZBA195XV, CAS-No. 8018-01-07, masa molar: 266.51 g/mol, para la preparación de todas las soluciones se utilizó agua destilada del mismo lote. Los matraces volumétricos empleados para el desarrollo del método son de grado analítico tipo “A”, los cuales fueron previamente lavados con agua y detergente libre de nitratos, posteriormente se enjuagaron con metanol.

7.2 Equipos:

Espectrofotómetro UV-Visible Genesys 6 y agitador Vortex M-37615 Thermolyne, micropipeta TransDig. 100-1000 uL. 7041-80 y termómetro de vidrio.

Cuadro 18. Equipo, material y reactivo utilizado en la estandarización del método.

Equipo/Material/Reactivo	Uso
Espectrofotómetro UV-Visible Genesys 6.	Identificación del analito y lectura de absorbancias de las diluciones.
Celda p/espectro de 10 mm. Pq/2 48228-00.	Lectura de absorbancia en el espectrofotómetro.
Agitador Vortex M-37615 Thermolyne.	Homogeneizar las diluciones.
Micropipeta TransDig. 100-1000 uL. 7041-80.	Preparar las diluciones.
Termómetro de vidrio.	Medir la temperatura de la solución madre.
Estándar Mancozeb (Etilenbisditiocarbamato de Zinc y Manganeso) Sigma-Aldrich lote # SZBA195X	Preparación de las soluciones.
Agua destilada.	Preparación de las soluciones.
Matraces volumétricos grado analítico tipo “A”.	Preparación de las soluciones.
Detergente libre de nitratos.	Lavado de cristalería.
Metanol (99.8 % pureza grado reactivo).	Enjuague de cristalería.
Frasco lavador integral (pizeta) de 500 mL.	Aforo de las diluciones.

Anterior al proceso de estandarización del método propuesto, en el Laboratorio de Biorremediación de la División Académica de Ciencias Biológicas de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, se procedió a identificar las condiciones analíticas del analito y la determinaron de las características de desempeño asociadas a la validación del mismo descritos por EURACHEM, 2005, como se menciona a continuación:

7.3. Confirmación de la identidad del analito.

Para confirmar la identidad del analito, se determinó la longitud de onda a la que se absorbe el Mancozeb, para ello se elaboró una solución concentrada del analito Mancozeb grado analítico de 100 mg/L en un matraz volumétrico tipo "A" disuelto en agua destilada (Cámara et al., 2004), a una temperatura de 30°C y agitada en un Vortex a una velocidad de 100 rpm, posteriormente, se prepararon diluciones por triplicado, a concentraciones de 1, 3, 6, 9, 12 y 15 mg/L, con el objetivo de hacer barridos de confirmación de la absorción del mensurado en la misma longitud de onda y obtener la repetibilidad de la señal analítica a diferentes concentraciones.

7.4. Validación interna del método.

Para validar este método, se determinaron los siguientes parámetros de desempeño:

7.4.1. Linealidad.

Una vez identificada la longitud de onda se prepararon por triplicado en matraces volumétricos de 25 mL tipo "A", 10 diluciones de la solución concentrada utilizando micropipetas, aforando con agua destilada y se agitó la solución en un equipo Thermolyne Maxi Mix II Type 37600 Mixera 100 rpm para homogeneizar, se leyeron las absorbancias de estas soluciones en un espectrofotómetro Ultravioleta Genesys 6 a una longitud de onda encontrada de 280 nm, concordando con el Método EPA 632 y verificado en laboratorio en un ambiente controlado, que permitió la estabilidad del analito, debido a que este es fotosensible (Ver figura 7).



Figura 7. Preparación de diluciones de la solución concentrada con el analito Mancozeb.

Posteriormente se calculó la correlación existente entre la concentración conocida y su lectura de absorbancia, aplicando la Ley de Lambert-Beer, para posteriormente graficar en Microsoft Excel 2007 los datos obtenidos: la señal de respuesta contra la concentración conocida del analito.

7.4.2. Límite de detección (LoD).

Para determinar el límite de detección se analizaron 10 blancos de muestras independientes sin fortificar, medidos cada uno a la vez, a estos datos se aplicó la fórmula obtenida por el método y se calculó la desviación estándar (s), aplicando la fórmula descrita por EURACHEM, la cual se muestra a continuación:

$$X_{LoD} = \bar{X}_{(B)} + 3s_{(B)}$$

Donde:

$\bar{X}_{(B)}$: es el promedio de las mediciones de los blancos.

$s_{(B)}$: es la desviación estándar de las mediciones de los blancos.

7.4.3. Límite de cuantificación (LoQ).

Para determinar el límite de cuantificación se analizaron 10 blancos de muestra fortificados con 1 mg/L de Mancozeb y medidos cada uno a la vez, a estos datos se aplicó la fórmula

obtenida por el método y se calculó la desviación estándar (s) de los blancos de muestra, aplicando la fórmula descrita por EURACHEM, como se muestra a continuación:

$$X_{LoQ} = \bar{X}(B) + 5s(B)$$

Donde:

$\bar{X}(B)$: es el promedio de las mediciones de los blancos.

s(B) : es la desviación estándar de las mediciones de los blancos.

7.4.4. Porcentaje de recuperación.

Para calcular el porcentaje de recuperación se colectó en frascos de cristal ámbar las muestras de agua obtenidas de los drenes aledaños a los aeródromos ubicados en la zona platanera del municipio de Teapa, Tabasco, aplicando la metodología descrita en la NOM-001-SEMARNAT-1996, las muestras se conservaron en neveras, lo anterior, debido a que el analito Mancozeb es fotosensible y se degrada a temperaturas por encima de los 25°C. (Ver figura 8).



Figura 8.- Colecta de muestras

Inicialmente se analizaron por triplicado las muestras de forma directa (sin fortificar), posteriormente se fortificaron con 0.60 mg/L y 13 mg/L de Mancozeb, para ambos casos se determinó el porcentaje de recuperación del mismo, aplicando la siguiente fórmula:

$$(\%) \text{ Recuperación} = 100 (C1-C2) / C3$$

Donde:

C1 = Concentración determinada en la muestra fortificada

C2 = Concentración determinada en la muestra no fortificada

C3 = Concentración de fortificación

Los cálculos se realizaron y analizaron utilizando Microsoft Excel 2007.

7.5. Validación del modelo de calibración.

Con la finalidad de validar el modelo de calibración de este método se utilizaron las siguientes técnicas quimiométricas:

7.5.1. Validación cruzada del método.

Por medio de la técnica estadística validación cruzada, se estimó el error de predicción asociado al ajuste del método, analizando en Microsoft Excel 2007 los valores de las concentraciones experimentales y los valores de las concentraciones esperadas (calculadas por el modelo), lo anterior, con la finalidad de verificar que exista una correlación lo más cercana a 1 entre la concentración conocida y la concentración obtenida por medio del método, para lo cual se realizó el gráfico de linealidad correspondiente.

7.5.2. Prueba t-Student para datos apareados.

Con los datos obtenidos se realizó en Microsoft Excel 2007 la prueba t-Student para datos apareados con la que se determinó si los valores de concentración experimentales son iguales a los valores de la concentración calculada por el modelo propuesto.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1. Confirmación de la identidad.

La confirmación de la identidad se obtuvo por medio del barrido espectral realizado en un espectrofotómetro Ultravioleta marca Genesys 6. Se logró observar que el máximo de absorción del analito se presentó a 280 nm (Figura 9), siendo consecuente este resultado con el registrado en el método 632 propuesto por EPA para la determinación de carbamatos y plaguicidas de urea en vertidos industriales y municipales.

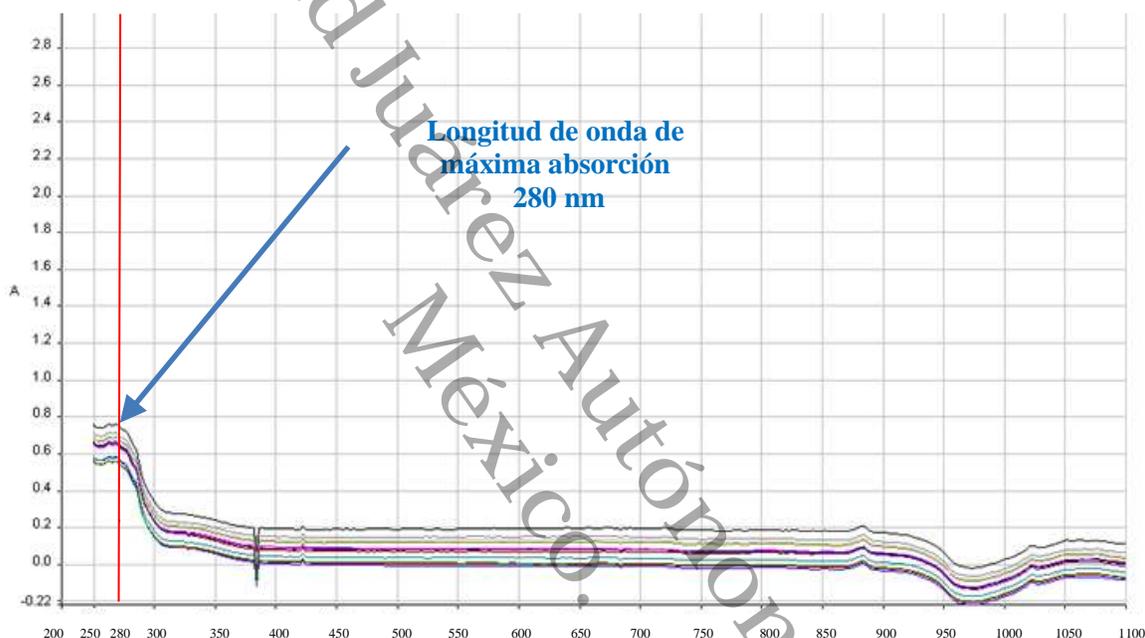


Figura 9. Espectro de absorción de Mancozeb.

8.2. Validación interna del método.

8.2.1.- Linealidad.

Este método analítico para la determinación de la concentración de Mancozeb disuelto en agua muestra correlación lineal entre las variables absorbancia y concentración, donde el valor de R^2 es de 0.9985, la cual se aproxima mucho al valor ideal de 1, esto se puede observar mediante la inspección visual de la gráfica de respuesta, como se muestra en la figura 10.

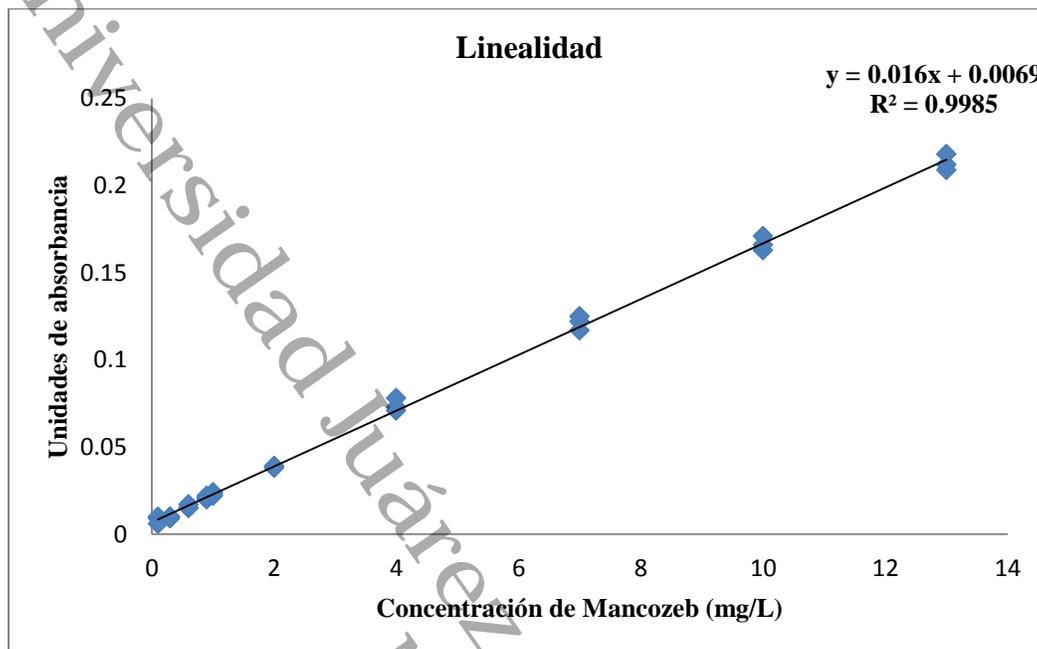


Figura 10. Calibración del método.

8.2.2.- Límite de Detección (LoD).

El Límite de Detección (LoD) obtenido es el siguiente:

$$X_{LoD} = \bar{X}(B) + 3s(B)$$

$$X_{LoD} = (0.07) + (0.154)$$

$$X_{LoD} = 0.23 \text{ mg/L}$$

Donde:

$\bar{X}(B)$: es el promedio de las mediciones de los blancos.

$s(B)$: es la desviación estándar de las mediciones de los blancos.

Partiendo del principio de que el LoD es la concentración mínima que puede detectarse confiablemente por el método, el resultado obtenido se considera aceptable, lo anterior de acuerdo a lo descrito por EURACHEM, 2005.

8.2.3. Límite de Cuantificación (LoQ).

El límite de cuantificación obtenido por el método es el siguiente:

$$X_{LoQ} = \bar{X}(B) + 5s(B)$$

$$X_{LoQ} = (0.972) + (0.36)$$

$$X_{LoQ} = 1.33 \text{ mg/L}$$

Donde:

$\bar{X}(B)$: es el promedio de las mediciones de los blancos.

$s(B)$: es la desviación estándar de las mediciones de los blancos.

Por medio de este método propuesto se obtuvo una buena determinación del LoQ, debido a que se detectó la concentración más baja del analito disuelto en agua con un nivel aceptable de precisión, repetibilidad y veracidad, lo anterior de acuerdo a lo establecido por EURACHEM, 2005.

8.2.4. Porcentaje de recuperación.

El porcentaje de recuperación promedio obtenido de las muestras de agua colectadas en el área de estudio fue de 96.69% (ver cuadro 19), lo anterior indica que el método funciona adecuadamente para determinar con precisión las concentraciones de Mancozeb en muestras de agua colectadas en campo, al mostrar un valor muy cercano al 100 % de recuperación del analito en la muestra, con lo cual, el método propuesto muestra que puede ser repetible no solo en condiciones de laboratorio, también es adecuado para conocer las concentraciones de Mancozeb en muestras de agua colectadas en sitio, siempre y cuando se mantengas las condiciones adecuadas de la misma, para evitar que se degrade.

Cuadro 19. Datos del porcentaje de recuperación de Mancozeb en muestras analizadas.

Absorbancia	Concentración Adicionada (mg/L)	Concentración Inicial (mg/L)	Concentración Calculada (mg/L)	Concentración Promedio (mg/L)	% Recuperación
0.088		5.49	5.49		
0.088	0.00	5.49	5.49	5.49	0.00
0.088		5.49	5.49		
0.096		5.49	5.99		
0.096	0.60	5.49	5.99	6.01	86.81
0.097		5.49	6.06		
0.308		5.49	19.24		
0.317	13.00	5.49	19.81	19.35	106.57
0.304		5.49	18.99		
% Recuperación promedio					96.69
% Desviación estándar					13.98
Desviación estándar relativa					0.14

8.3.- Validación del modelo de calibración.

Al realizar las técnicas quimiométricas de los datos obtenidos por el modelo de calibración, se pudo observar que el modelo de calibración es adecuado para el propósito que fue diseñado, lo anterior, debido a los resultados que se obtuvieron, los cuales se muestran a continuación:

8.3.1. Validación cruzada.

Al realizar la prueba estadística validación cruzada en la cual se estimó el error de predicción asociado al ajuste del método de los valores de las concentraciones experimentales y los valores de las concentraciones esperadas (calculadas por el modelo), se muestra que existe una correlación lineal adecuada de $R^2 = 0.9999$ entre dichos parámetros, cabe destacar que las concentraciones obtenidas por medio del modelo a partir de 1 mg/L presentan precisión en su determinación la cual se puede observar en la siguiente grafica del coeficiente de regresión y determinación entre las variables de concentración de Mancozeb y unidades de absorbancia.

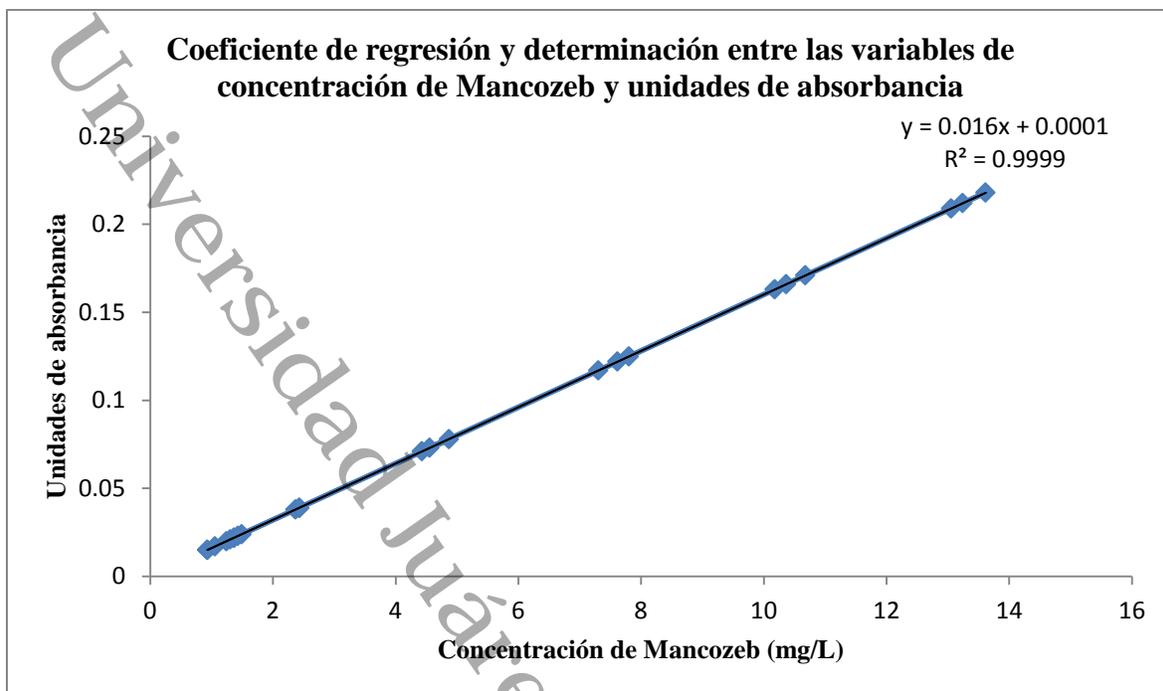


Figura 11. Coeficiente de regresión y determinación entre las variables de concentración de Mancozeb y unidades de absorbancia.

8.7. Prueba t-Student.

En el siguiente cuadro, se muestra el resultado de la prueba t-Student realizada a los datos obtenidos por el modelo de calibración:

Cuadro 16. Prueba t-Student.

	Experimental	Calculado
Media	3.89	4.26
Varianza	20.9943	21.4006
Observaciones	10	10
Coefficiente de correlación de Pearson	0.9991	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	9	
Estadístico t	-6.102067912	
P(T<=t) una cola	8.93977E-05	
Valor crítico de t (una cola)	1.8331	
P(T<=t) dos colas	0.0001	
Valor crítico de t (dos colas)	2.2621	

Con lo antes expuesto, podemos demostrar que la hipótesis planteada inicialmente resulta verdadera, debido a que se obtuvo como resultado, que no existe diferencia hipotética significativa entre los valores de concentración experimental y las concentraciones obtenidas por el método, mostrando un valor igual a cero, además el valor crítico de t para dos colas es igual a 2.2621.

9. CONCLUSIONES

Este método analítico cumple con el propósito para el que fue establecido, detectar concentraciones mayores a 1 mg/L de Mancozeb (Etilenbisditiocarbamato de Zinc y Manganeso) disuelto en agua por medio de espectrofotometría, lo cual se confirma con la validación del mismo, por medio de los parámetros de desempeño que se mencionan en la guía EURACHEM, 2005, así como la validación cruzada que se realizó, demostrando que al aplicarlo, fue posible conocer la concentración de Mancozeb (Etilenbisditiocarbamato de Zinc y Manganeso) en muestras de agua contaminadas y fortificadas con dicho analito a concentraciones mayores a 1 mg/L con un grado de precisión y de repetibilidad aceptable.

La mayor absorción de Mancozeb se presentó a una longitud de onda de 280 nm empleando agua como diluyente, esta longitud de onda coincide con la reportada por la EPA (Environmental Protection Agency) en el método 632 para la determinación plaguicidas carbamatos y urea en aguas residuales municipales e industriales.

El límite de detección fue de 0.23 mg/L, lo cual muestra ser aceptable, debido a que permite tener un rango de probabilidad de error muy pequeño en el método. Así mismo el límite de cuantificación fue de 1.33 mg/L, siendo la concentración más baja del analito, que puede ser determinada con un nivel aceptable de precisión y de repetibilidad (EURACHEM, 2005). Este método puede ser utilizado para realizar estudios de monitoreo en cuerpos de agua adyacentes a los cultivos donde se fumiga con Mancozeb, para así prevenir la mortandad de peces, cabe destacar que las LC_{50} para el pez *Cyprinodon variegatus* es de 1.6 mg/L.

Este método analítico demostró correlación lineal entre las variables absorbancia y concentración muy próxima al valor ideal de 1, con un valor de R^2 es de 0.9985, con lo cual se demuestra que es un método que funciona adecuadamente para determinar con precisión las concentraciones de Mancozeb disuelto en agua.

Al presentar un porcentaje de recuperación de 96.69, indica que el método funciona adecuadamente para determinar las concentraciones de Mancozeb tanto en pruebas de laboratorio como en muestras colectadas en campo y en diferente tiempo al mostrar un valor muy cercano a 100%.

El análisis estadístico Prueba t- Student para datos apareados comprueba que no existe diferencia entre los datos experimentales y los calculados por el modelo, por lo tanto, no existen diferencias significativas entre los valores arrojados por el modelo y los valores experimentales, permitiendo generar confianza sobre la precisión de los resultados.

Además de cumplir con todos los requerimientos descritos por la Guía EURACHEM para la validación de métodos analíticos, cabe hacer mención que este método propuesto posee características propias que realzan su importancia, las cuales se mencionan a continuación:

1. Es amigable con el ambiente, debido a que no se generan residuos adicionales al analito analizado, al utilizar solamente agua destilada como diluyente.
2. Actualmente, este es el único método para el análisis de Mancozeb (Etilenbisditiocarbamato de Manganeso) por medio de un método analítico de espectroscopia ultravioleta en la Entidad.
3. Es de respuesta rápida, permitiendo contar con datos expeditos y precisos.
4. Es de bajo costo, como resultado de su óptimo proceso de medición del analito.
5. Determinación del analito en aguas de diferente origen.

10. REFERENCIAS

1. Corra, L., 2009. Herramientas de capacitación para el manejo responsable de plaguicidas y sus envases: efectos sobre la salud y prevención de la exposición. - 2a ed. Organización Panamericana de la Salud – OPS. Buenos Aires: 300 p.
2. Domínguez, M.C., G. Peñuela, M. Flores. 2009. Método Analítico para la determinación de etilentiourea (ETU) subproducto del Mancozeb en un andisol de Oriente Antioqueño. Rev. Fac. Ing. Univ. Antioquia. (49):42-49.
3. Domínguez-Rodríguez V. I. Guerrero-Peña A. Adams R. H. Miranda-Cruz E. Obrador-Olán J. J. Zavala-Cruz J. and Vaquera-Huerta H. 2015. Eco-friendly spectrophotometric method as alternative for carbon disulfide-free determination of Ethylenethiourea in surface water. Research Journal of Chemistry and Environment, Vol. 9(5):1-7.
4. Dow Agrosciences, Dithene FMB (Mancozeb) ficha Técnica de Dow AgroSciences (<http://www.dowagro.com/es-mx/latamnorte/productos/proteccion-de-cultivos/fungicida/dithane-m45-nt>).
5. EURACHEM. 2005. Segunda edición. La Adecuación al Uso de los Métodos Analíticos una Guía de Laboratorio para Validación de Métodos y Temas Relacionados.
6. Eurolab España. P.P. Morillas y colaboradores. Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos – Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados (1ª ed. 2016).
7. FAO, 2002. Código internacional de conducta para la distribución y utilización de plaguicidas (versión revisada). Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Roma. <http://www.fao.org/3/a-a0220s.pdf>.
8. FAO, 2007. Agenda Item 7(b) CX/PR 07/39/6. Codex Committee on Pesticide Residues. Thirty-ninth Session Beijing, China.
9. Hernández, R., R. Fócil, W. Hernández, L. Gómez. 2008. Detección de aberraciones cromosómicas en trabajadores expuestos al fungicida Mancozeb en fincas Plataneras de Teapa, Tabasco. Semana de Divulgación y Video Científico 2008.

10. HELM de México, S.A. de C.V. Manual Técnico CYRIZATE (CYRIZATE, HELM CYMOXANIL 8% + MANCOZEB 64%). <http://esdocs.com/doc/1533548/manual-t%C3%A9cnico---helm-de-m%C3%A9xico-sa>
11. INEGI, 2008. Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos, con clave geoestadística 27016. http://www3.inegi.org.mx/contenidos/app/mexicocifras/datos_geograficos/27/27016.pdf
12. Miller, J.C., J.N. Miller. 2002. Estadística y quimiometría para química analítica. Pearson Educación S.A. España.
13. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=13307026, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/13307026>. Documento recuperado el 28 de septiembre de 2017).
14. Instituto Mexicano de Normalización y Certificación, A.C. (IMNC) (2006). Norma Mexicana NMX-EC-17025-IMNC-2006 / ISO/IEC 17025:2005, Requisitos Generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración.
15. OMS. 2004. Prevención de los riesgos para la salud derivados del uso de plaguicidas en la agricultura. Organización Mundial para la Salud. Francia.
16. Payam, R., Lei T., Huan. 2008. k-fold Cross-Validation. Arizona State University.
17. Pérez, L., F. Mauri, A. Hernández, E. Abreu, A. Porras. 2000. Epidemiología de la Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en Cuba. 1. Pronóstico bioclimático de los tratamientos de fungicidas en bananos (*Musa acuminata* AAA) Revista Mexicana de fitopatología. 18(001) pp.15-26.
18. Ramírez, Ja., Lacasaña, M. Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. Arch Prev Riesgos Labor. 2001; 4(2), 67-75.
19. Rivas, G., F. Rosales. 2003. Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de Musáceas. Ecuador.
20. Skoog, D., D. West, J. Holler, S. Crouch. 2001. Química Analítica. Ed. 7ª. McGraw-Hill Interamericana editores, México, D.F.
21. U.S. EPA (U.S. Environmental Protection Agency), 1982. Method 632 The Determination of Carbamate and Urea Pesticides in Municipal and Industrial Wastewater. Cincinnati, Ohio.

22. "U.S. EPA (U.S. Environmental Protection Agency), 2005. Reregistration Eligibility.
23. Decision for Mancozeb, List B Case No. 0643, EPA 738-R-04e012. U.S. EPA, Washington, DC.
24. VIM. 2008. Vocabulario Internacional de Metrología, conceptos fundamentales y generales y términos asociados.
25. Wade, L. 2012. Química Orgánica, 7a. edición, por Pearson Educación de México, S.A. de C.V. Naucalpan de Juárez, Estado de México.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

11. ACRÓNIMOS COMUNMENTE USADOS.

ATP	Adenosín trifosfato.
CENAM	Centro Nacional de Metrología.
DDT	Diclorodifeniltricloroetano.
EBDC	Etileno Bisditiocarbamato.
EC₅₀	Concentración Efectiva Media (Median Effective Concentration).
EDWCs	Las concentraciones estimadas de ETU en agua potable.
EEC	Concentración Ambiental Estimada (Estimated Environmental Concentrations).
EPA	Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de Norteamérica.
ETU	Etilentiourea.
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (Food and Agriculture Organization of the United Nations).
FRAC	Comité de Acción de la Resistencia de los Fungicidas.
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (High Performance Liquid Chromatography).
IEC	International Electrotechnical Commission),
ISO	International Organization for Standardization.
LC₅₀	Concentración Letal Media (Median Lethal Concentration).
LOAEC	Mínima Concentración de Efectos Adversos Observada (Lowest Observable Adverse Effect Concentration).
LOCs	Niveles de Cuidado (Levels of Care).
LoD	Límite de detección.
LoQ	Límite de Cuantificación.
MRID	Número de Identificación del Registro Maestro (Master Record Identification Number).
NMX	Norma Mexicana.
NOAEC	No se observó concentración de efectos adversos.
OMS	Organización Mundial de la Salud.
PVC	Cloruro de Polivinilo.
RED	Decisión del Organismo de los EE.UU. (Reregistration Eligibility Decision).
RQ	Cociente de Riesgo (Risk Quotient).
UV	Ultravioleta.

12. ANEXO FOTOGÁFICO.



Plantación afectada por Sigatoka negra.



Hoja de plátano afectada.



Fumigación con equipo de aplicación manual.



Fumigación sin equipo de protección básico.



Descarga de agua residual de fumigación aledaña al aeródromo.



Coloración amarilla en descarga de agua.



Material utilizado durante el diseño del método.



Espectrofotómetro UV-Visible Genesys 6, utilizado para realizar las mediciones de absorbancias, durante el desarrollo del método.