

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA**

**ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR DE GANDIA**

*CIENCIAS AMBIENTALES*

---



**UNIVERSIDAD  
POLITECNICA  
DE VALENCIA**



**ESCUELA POLITÉCNICA  
SUPERIOR DE GANDIA**

**“NUEVO MÉTODO DE DETERMINACIÓN DEL  
PLAGUICIDA METAZACLOR MEDIANTE ANÁLISIS  
POR INYECCIÓN EN FLUJO CON DETECCIÓN  
QUIMIOLUMINISCENTE”.**

**TRABAJO FINAL DE CARRERA**

**AUTOR:**

**Estela Luna Jordán**

**DIRECTORES:**

**José Luis López Paz**

**Mónica Catalá Icardo**

**GANDÍA, 2011**



# INDICE

1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Plaguicidas.....	3
1.1.1 Introducción .....	3
1.1.2 Los plaguicidas: clasificaciones y propiedades .....	5
1.1.3 Tipos de envenenamiento .....	8
1.2 Metazaclor .....	10
1.2.1 Propiedades .....	10
1.2.2 Efectos ecológicos .....	10
1.3 Metodología del análisis por inyección en flujo (FIA) .....	11
1.3.1 Introducción .....	11
1.3.2 Componentes del FIA .....	12
1.3.3 Características del FIA.....	13
1.4 Quimioluminiscencia.....	15
1.4.1 Introducción .....	15
1.4.2 Fundamentos de la Quimioluminiscencia.....	16
1.5 Combinación FIA-quimioluminiscencia .....	17
1.6 Uso de fuentes de irradiación .....	18
2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO .....	21
2.1 Objetivos.....	23
2.2 Plan de trabajo .....	24



3. INSTRUMENTACIÓN Y REACTIVOS .....	25
3.1 Reactivos .....	27
3.2 Aparatos.....	29
3.3 Material FIA .....	30
4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....	31
4.1 Selección del montaje FIA .....	33
4.2 Selección del sistema oxidante .....	35
4.2.1 Oxidantes ensayados.....	35
4.2.2 Estudio del efecto de la concentración del sistema oxidante.....	40
4.3 Estudio de sensibilizadores.....	47
4.4 Optimización de las variables más importantes .....	54
4.4.1 Estudio del pH .....	54
4.4.2 Influencia del volumen de muestra insertada .....	56
4.4.3 Efecto del tiempo de fotodegradación/ oxidación .....	57
4.4.4 Estudio de la temperatura .....	58
4.4.5 Estudio de la concentración de oxidante.....	60
4.4.6 Montaje FIA finalmente seleccionado.....	61
5. CARACTERISTICAS ANALÍTICAS DEL MÉTODO PROPUESTO.....	63
5.1 Intervalo de linealidad .....	65
5.2 Estudio de interferentes .....	66
5.3 Determinación de la velocidad de muestreo y repetitividad.....	69
5.4 Límite de detección .....	70
6. CONCLUSIONES .....	71
7. BIBLIOGRAFÍA.....	75



# **1. INTRODUCCIÓN**



## 1.1 Plaguicidas

### 1.1.1 Introducción

La contaminación de las aguas continentales y subterráneas producida por la presencia de plaguicidas ocasiona un problema medioambiental grave que afecta la salubridad del ambiente. Los plaguicidas se encuentran en el ambiente como consecuencia de diversas actividades agrícolas, pero también como resultado de los tratamientos fitosanitarios llevados a cabo con fines no agrícolas, como por ejemplo los que se realizan en los campos de golf, en los márgenes de las carreteras, en las vías de los trenes, en los metros, aeropuertos, etc.

El uso de plaguicidas se ha incrementado enormemente durante las 3 últimas décadas representando un problema en la depuración de las aguas. A título de ejemplo pueden observarse los plaguicidas más usados en los EE.UU, en el año 1993. [1,2]

Pesticida	Toneladas	Pesticida	Toneladas
Atrazina	31.500-33.750	Clorpirifos	4.500-6.750
Metalacloro	27.000-29.250	Clorotalonilo	4.500-6.750
Alacloro	20.250-22.500	Propanilo	3.150-5.400
Bromuro de metilo	13.500-15.750	Dicamba	2.700-4.500
Cianazina	13.500-15.750	Terbufos	22.250-3.600
Dicloropropeno	13.500-15.750	Bentazona	1.800-3.150
2,4-D	11.250-13.500	Mancozeb	1.800-3.150
Metam-sodio	11.250-13.500	Paratión	1.800-3.150
Trifluralin	9.000-11.250	Simazina	1.350-2.700
Glifosato	6.750- 9.000	Butilato	1.350-2.700

*Tabla 1. Plaguicidas utilizados en EE.UU. en el año 1993.*

Entre ellos, destaca en el segundo puesto el metazaclor, el plaguicida que se va a estudiar en este proyecto.

En Europa el uso de plaguicidas ha variado mucho en los últimos años, pero la Comisión de la Comunidad Europea, ha publicado un listado con los plaguicidas usados en una cantidad superior a las 500 toneladas por año tal y como se refleja en la tabla 2. [1]

Alacloro	2,4-DP	MCCP
Atrazina	1,2-dicloropropano	Metazacloro
Benazolina	1,3-dicloropropeno	Metam-sodio
Bentazona	Dimetoato	Metabencetiazuron
Carbaril	Diurón	Bromuro de metilo
Carbetamida	Fenpropimorf	Metalacloro
Cloridazona	Glifosato	Forato
Cloromequat	Ioximilo	Procloraz
Clorotalonilo	Isoproturón	Propiconazola
Clortoluron	Mancozeb	Propineb
Cloruro de colina	Maneb	Piretrin
2,4-D	2,4,5-T	TCA
Triallato	Tridemorf	Trifluralin

*Tabla 2. Plaguicidas utilizados por encima de las 500 toneladas al año en Europa.*

De nuevo, como en el caso de EE.UU, cabe destacar la presencia del uso de metazaclor.

En la mayoría de las aplicaciones ambientales se utilizan formulaciones de plaguicidas, es decir, productos que contienen el plaguicida en un porcentaje más o menos elevado conjuntamente con aditivos y coadyuvantes que facilitan su acción. Una vez aplicado, la concentración del plaguicida en el medio va variando como consecuencia de procesos de dispersión, volatilización, degradación química y biológica, y lixiviación.

El control de plagas incluye intervenciones ambientales que reducen las plagas de insectos, de los organismos patógenos y las poblaciones de malas hierbas, con el fin de lograr incrementar la producción. Las técnicas empleadas para el control de las plagas pueden ser de tres tipos:

- Químicas

- Físicas

- Biológicas

El uso de plaguicidas permite proteger los cultivos en la agricultura y controlar las enfermedades transmitidas por vectores para garantizar la salud pública. No obstante, estos compuestos también presentan una serie de inconvenientes relacionados con su alta actividad biológica y en algunos casos con su persistencia en el ambiente, pudiendo causar efectos adversos sobre la salud humana y sobre el medio ambiente. [3-5]

### 1.1.2 Los plaguicidas: clasificaciones y propiedades

Se considera un plaguicida aquella sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, especies indeseadas de plantas o animales capaces de causar daños o interferir de cualquier otra forma. Esa interferencia puede darse tanto en la producción, como en el procesamiento, almacenamiento o transporte de los alimentos u otros productos agrícolas que pueden ser administrados a los animales para el control de insectos, arácnidos u otras plagas en sus organismos. [1]

#### Clasificaciones

Para la clasificación de los plaguicidas existen varios criterios, entre los que se destacan:

-Según su origen (naturales o sintéticos);

ALGUNOS PLAGUICIDAS NATURALES Y SINTÉTICOS	
NATURALES	SINTETICOS
Nicotina	DDT
Piretrinas	2,4-D
Rotenona	Malation

*Tabla 3. Ejemplos de plaguicidas según el origen.*

-Según la plaga a la que atacan: así a las sustancias que impiden o retrasan el desarrollo de los hongos se les llama fungicidas; a las que controlan o eliminan a los insectos, insecticidas; a las que controlan a los ácaros, acaricidas, etc.

Pese a su popularidad, esta clasificación puede causar confusiones, ya que en muchos casos una sustancia puede ser, por ejemplo, insecticida y nematicida a la vez. Además, no permite correlacionar la estructura de la sustancia y sus efectos tóxicos, su mecanismo de acción, la prevención de riesgos en su uso, el tratamiento médico, su comportamiento ambiental y otros puntos igualmente importantes.

<b>CLASIFICACIÓN DE LOS PLAGUICIDAS SEGÚN LA PLAGA A LA QUE ATACAN</b>	
<b>PLAGUICIDA</b>	<b>ATACA A:</b>
Insecticida	Insectos
Fungicida	Hongos
Molusquicida	Moluscos
Ovicida	Huevecillos
Herbicida	Malezas
Acaricida	Ácaros
Rodenticida	Roedores
Nematicida	Nemátodos

*Tabla 4. Clasificación de los plaguicidas según la plaga a la que atacan.*

-Los plaguicidas también se pueden clasificar de acuerdo con su presentación comercial en: polvos, líquidos, gases y comprimidos.

-Otra forma de clasificar los plaguicidas es con base a su persistencia en el ambiente; de este modo hay plaguicidas no persistentes, moderadamente persistentes, persistentes y permanentes.

<b>CLASIFICACION DE PLAGUICIDAS</b>
No persistentes, 0-12 semanas, ej. malation
Moderadamente persistente, 1-18 meses, ej. atrazina 2,4-D
Persistentes, Menos de 20 años, e.j DDT
Permanentes, Más de 20 años, e.j arsenicales y mercuriales

*Tabla 5. Vida media y ejemplos de plaguicidas.*

-La toxicidad es otro parámetro útil para clasificar a los plaguicidas. Conforme a ella los plaguicidas se agrupan en tres clases: los que tienen efectos a corto, a medio y largo plazo. Esta clasificación es muy útil en el manejo y en el seguimiento epidemiológico de las intoxicaciones con estos compuestos. De este modo, la Organización Mundial de la Salud (OMS) agrupa a los plaguicidas según su dosis letal media y los asigna a un grupo específico conforme a su peligrosidad.

La actividad biológica de un plaguicida está influenciada por su química y propiedades físicas. Estas afectarán a los posibles efectos medioambientales derivados de su escorrentía en cursos de agua o a su vida media. [6]

### Propiedades de los plaguicidas

#### *Solubilidad en agua*

La solubilidad determina la movilidad de las sustancias. Podemos diferenciar tres tipos de sustancias según sea su solubilidad:

- Mayor de 500 mg/L: muy móviles en el ecosistema, alcanzando las máximas concentraciones en ecosistemas acuáticos.
- Mayor de 25 mg/L: no son persistentes en los organismos vivos.
- Menor de 25 mg/L: tienden a inmovilizarse en los suelos y a concentrarse en los organismos vivos.

#### *El coeficiente de partición lípido-agua.*

Este coeficiente muestra qué cantidad de una sustancia se disuelve en agua y cuánto en lípido. Esta variable nos permitirá saber si un plaguicida podrá atravesar las membranas biológicas y acumularse en los tejidos grasos de los organismos vivos; a mayor coeficiente de partición lípido/agua mayor riesgo para el medio ambiente.

#### *La presión de vapor.*

Determina su volatilidad. Podemos distinguir varios grupos de plaguicidas en función de la presión de vapor:

- Mayor de  $10^{-3}$  mm de Hg a  $25^{\circ}\text{C}$ : se dispersan hacia la atmósfera.
- Entre  $10^{-4}$  y  $10^{-6}$  mm de Hg a  $25^{\circ}\text{C}$ : sustancias ligeramente volátiles.
- Menor de  $10^{-7}$  mm de Hg: no volátiles, son los más persistentes en suelos y agua.

#### *Disociación e ionización.*

Las sustancias al solubilizarse pueden presentar dos comportamientos distintos:

- No se disocian; sustancias no iónicas.
- Se disocian; sustancias iónicas. Estas a su vez pueden tener carga positiva (catiónicas) o bien cargas negativas (aniónicas). Los plaguicidas aniónicos y los no iónicos son móviles en los suelos, en tanto los catiónicos son adsorbidos, inmovilizándose en ellos.

#### *Degradabilidad*

Se refiere a la persistencia de la actividad de un plaguicida. Esta puede ser permanente o bien puede disminuir con el tiempo al degradarse por factores químicos, físicos o biológicos.

Los plaguicidas causan impactos negativos, principalmente, en dos tipos de ambientes:

- Ambientes terrestres: contaminan los suelos y la biota terrestre y pueden persistir desde días hasta años.
- Ambientes acuáticos: contaminan el agua.

### **1.1.3 Tipos de envenenamiento**

Los plaguicidas son utilizados en gran variedad de actividades forestales, en granjas, hábitats acuáticos, vías, carreteras, zonas urbanas, jardines, etc. Su uso tan extendido hace inevitable el contacto con personas y animales, que pueden sufrir envenenamiento agudo o crónico [7]. Los tipos de envenenamiento que pueden darse son los siguientes:

#### *Envenenamiento agudo.*

Es el envenenamiento que se produce por una exposición corta al plaguicida, y que puede producir la muerte o el deterioro de los organismos vivos.

*Envenenamiento crónico.*

Se produce por la exposición prolongada en el tiempo de los organismos vivos a niveles de plaguicida no letales.

*Envenenamiento secundario.*

Los plaguicidas también pueden afectar a los seres vivos cuando estos consumen alimentos o presas que contienen residuos de plaguicidas.

*Efectos indirectos.*

Además del envenenamiento, los seres vivos también pueden verse afectados de manera indirecta cuando su hábitat o su alimento son modificados por los plaguicidas. Un ejemplo de ello lo constituye el efecto de los herbicidas, ya que estos pueden reducir el alimento, cobertura y sitios para la anidación de insectos, aves o peces al acabar con determinados tipos de plantas.

Durante mucho tiempo se ha intentado desarrollar un sistema práctico para evaluar la toxicidad aguda y crónica de las sustancias químicas, incluyendo a los plaguicidas. El método más comúnmente empleado y avalado por la OMS para medir la toxicidad es la Dosis Letal 50 (DL<sub>50</sub>) que se define como la cantidad mínima de una sustancia, generalmente expresada en mg/kg, que es capaz de matar al 50% de una población de animales de prueba. Los resultados de DL<sub>50</sub> obtenidos para una sustancia dada se extrapolan a los humanos y sirven de base para los sistemas de clasificación de la toxicidad.

<b>CATEGORÍA</b>	<b>TIPO TOXICOLÓGICO</b>	<b>DL<sub>50</sub> en mg/kg de masa corporal</b>
Extremadamente tóxico	I	< 5.0
Altamente tóxico	II	5.0-50.0
Moderadamente tóxico	III	50.0-500.0
Ligeramente tóxico	IV	500.0

Tabla 6. Valores de DL<sub>50</sub> que indican la categoría toxicológica de los plaguicidas.

## 1.2 Metazaclor

### 1.2.1 Propiedades

El metazaclor que según la nomenclatura IUPAC es [2-chloro- *N* -(pyrazol-1-ylmethyl) acet-2',6'-xylidide], es un herbicida, que pertenece al grupo químico de las cloroacetamidas. Su solubilidad en agua es de 450 mg/L a 20 °C y su coeficiente de partición octanol/agua a la misma temperatura es  $3.09 \cdot 10^2$ , siendo la presión de vapor a 25°C de 0.093 mPa. [8]

Su estructura molecular queda representada en la figura 1.

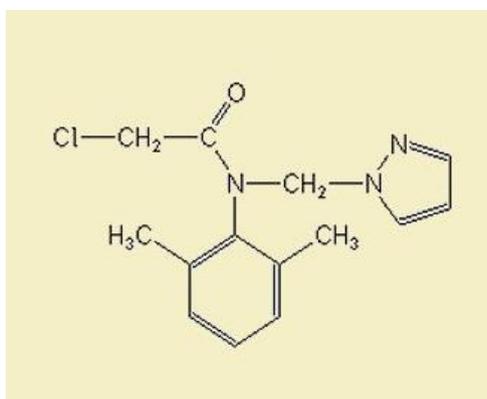


Figura 1. Estructura molecular del metazaclor.

### 1.2.2 Efectos ecológicos

La bioquímica del metazaclor inhibe la división celular bloqueando la síntesis de proteínas. El modo de acción de este herbicida es selectivo, así es absorbido por los hypocotilos y raíces produciendo una inhibición de la germinación.

Se emplea principalmente como sistema de pre-emergencia y el control temprano de pastos tanto de invierno, como anuales (*Alopecurus myosuroides*, *Apera spica-venti*, *Avena fatua*, *Digitaria sanguinalis*, *Echinochloa crus-galli*, *Poa annua* y *Setaria* spp). También es usado para el control de las malas hierbas de hoja ancha (*Amaranthus*, *Anthemis*, *Matricaria*, *Polygonum*, *Sinapis*, *Solanum*, *Stellaria*, *Urtica* y *Veronica* spp.), en alcachofas, brócoli, espárragos, coles de Bruselas, coles, coliflor, maíz dulce, ajo, rábano, col rizada, puerros, maíz, mostaza blanca, cebolla, frutas de pepita, la soja, frutas de hueso, fresas, caña de azúcar, girasol, tabaco y nabos. [9]

### 1.3 Metodología del análisis por inyección en flujo (FIA)

#### 1.3.1 Introducción

El creciente número de controles analíticos requeridos en áreas como el medio ambiente, para realizar el control de los contaminantes, ha hecho surgir la necesidad de la automatización de los procesos analíticos.

Las ventajas que tienen los métodos automatizados como el FIA (Flow Injection Analysis), son tanto económicas, como de funcionamiento simple y fácil manejo, además proporcionan un elevado grado de automatización. Esta metodología consiste en un tipo de análisis automatizado en flujo continuo, que se basa en la inserción y dispersión controlada de un volumen de muestra en una corriente continua de una disolución. Esta disolución hace el papel de portador, transportando la muestra hasta el detector, donde se genera una señal transitoria en forma de pico denominada fiagrama.

Los métodos de inyección en flujo en su estado actual, fueron descritos por primera vez a mediados de la década de los setenta por Ruzicka y Hansen en Dinamarca, y Stewart en EE.UU. [10, 11]

El FIA, en su modalidad más frecuente, puede ser considerado un método cinético de análisis, bajo la modalidad de tiempo fijo, ya que ni la homogeneidad física ni el equilibrio químico se alcanzan en el momento en que se lleva a cabo el análisis. Este hecho ofrece nuevas posibilidades con respecto a los métodos en los que se alcanza el equilibrio, como puede ser la medida de intermedios de reacción de vida corta, tales como los radicales libres. Este tipo de compuestos es imposible de determinar mediante las técnicas en estático convencionales.

### 1.3.2 Componentes del FIA

Los componentes básicos de un sistema FIA se muestran en la imagen 1, y son los siguientes:



*Imagen 1. Montaje FIA en el que se aprecia la bomba peristáltica, la válvula de inserción y los tubos y conexiones empleados en el proyecto.*

-Unidad de propulsión: establece un flujo constante de las disoluciones, ya que en caso contrario la reproducibilidad del método se vería afectada de manera considerable. El sistema más utilizado es una bomba peristáltica.

-Sistema de inyección: permite la inserción de un volumen conocido de la muestra sin tener que parar el flujo. El sistema de inyección más utilizado es una válvula rotatoria que presenta seis orificios (dos de entrada, dos de salida y dos conectados mediante un bucle de volumen variable). Con el objetivo de reducir el consumo de reactivos se han diseñado válvulas de multiinyección que permiten insertar volúmenes precisos, tanto de muestra como de reactivos, en una sola inyección.

-Reactor: puede presentar diferentes configuraciones: un tubo recto hueco, en forma de serpentin, una cámara de mezclado, un tubo relleno de material inerte o activo químicamente.

-Tubos: existen de dos tipos;

- Por una parte se encuentran los tubos flexibles de bomba peristáltica, cuyo diámetro interno determina la velocidad de flujo. El material con el que se fabrican depende del tipo de fluido y deben renovarse con frecuencia, ya que se deterioran con el tiempo.

- Por otra parte, se encuentran los tubos para conexiones y reactores cuyo diámetro interno oscila entre 0.3 y 1.0 mm y que suelen ser de teflón. Las conexiones entre tubos son muy variadas y deben garantizar el mínimo volumen muerto para que no se altere la dispersión ni disminuya la reproducibilidad del sistema.

-Celda de flujo: ésta es incorporada a un instrumento de medida que traduce la señal a un registrador. Generalmente se usan celdas de flujo que poseen un volumen lo más pequeño posible con el objeto de evitar problemas de dispersión y conseguir mayor sensibilidad. El flujo que sale de la misma es desechado.

La forma de la curva que se obtiene como registro es muy similar a las que se obtienen con otras técnicas en flujo continuo tales como las técnicas cromatográficas. Son tres los parámetros característicos de estos registros:

- Altura o área de pico: está relacionada con la concentración del analito.
- Tiempo de residencia: es el tiempo durante el cual el analito está en el reactor (entre el momento en que se produce la inyección y el momento en que se produce la máxima señal).
- Tiempo de retorno: es el tiempo que transcurre desde que se obtiene la señal más alta hasta que se alcanza de nuevo la línea de base.

### **1.3.3 Características del FIA**

Las técnicas en estático (también llamadas manuales) tienen mayor sensibilidad que los métodos FIA, debido en primer lugar a la dispersión física (o dilución en el flujo) y en segundo lugar al tiempo de reacción, que al ser más corto en los métodos FIA, no permite alcanzar un rendimiento del 100%. De esta forma, si modificamos las condiciones experimentales para favorecer el rendimiento, aumenta la dispersión y viceversa, es decir, en los métodos FIA donde hay un proceso químico adicional, estos efectos son contrapuestos.

Así, para optimizar el sistema hay que alcanzar un equilibrio entre ambas variables, ajustando las condiciones de operación en el montaje.

Sin embargo, el hecho de que se trate de métodos cinéticos, hace que, la selectividad de los métodos FIA sea en general más elevada que la de los métodos manuales, ya que la perturbación de especies extrañas en el sistema se minimiza gracias a la manipulación de las condiciones experimentales y del diseño de estos métodos.

Por otra parte, a pesar de que el FIA es una metodología que se basa en medidas en un sistema que no ha alcanzado el equilibrio, se alcanzan niveles de reproducibilidad muy elevados incluso con concentraciones bajas del analito. También cabe destacar que estos métodos son muy rápidos, siendo las velocidades de muestreo hasta diez veces superiores a otras técnicas de análisis en flujo continuo.

Así pues, el FIA es una técnica que se caracteriza por su sencillez, debido a que no utiliza montajes muy sofisticados, por su fundamento simple y porque posee una gran facilidad de manejo. Además, esta metodología también destaca por su versatilidad ya que se pueden sustituir e incorporar de forma sencilla y cómoda, diferentes componentes para optimizarla según las necesidades que se planteen. [12]

Desde el punto de vista económico, el FIA presenta ventajas que se manifiestan en dos vertientes:

- El gasto de reactivos y muestra es de diez a cien veces menor que en las técnicas manuales. Este aspecto es muy importante cuando los reactivos son caros o contaminantes y/o el volumen de muestra asequible es pequeño. La relevancia de este aspecto no es únicamente económica sino también medioambiental, ya que permite reducir el vertido de reactivos proporcionando sistemas más limpios.

- El precio de los componentes o accesorios necesarios para preparar los montajes

FIA es bajo.

## 1.4 Quimioluminiscencia

### 1.4.1 Introducción

En los últimos años el uso de la quimioluminiscencia (QL), ha experimentado un creciente interés desde el punto de vista analítico, ya que representa una alternativa barata, simple y sensible para cuantificar una gran variedad de compuestos.

Aunque su uso en aplicaciones analíticas es reciente, este método ya se conocía desde el siglo III a.C., y se ha ido desarrollando como herramienta de gran utilidad, debido a su alta sensibilidad y selectividad. En el último siglo se pueden destacar dos etapas claramente diferenciadas:

-La primera va de 1928 a 1940; durante este periodo de tiempo se buscaron nuevos compuestos o sistemas quimioluminiscentes.

- Después de la 2ª Guerra Mundial hasta la actualidad; en este periodo se ha producido una mejora en la instrumentación, además de un avance en los conceptos teóricos de la QL.

Por otro lado, el hecho de presentar numerosas ventajas, entre las que destacan los bajos límites de detección, rangos dinámicos amplios, alta sensibilidad y gran versatilidad, ha aumentado el interés de la QL para fines analíticos. [13]

Actualmente, la tendencia general en Química Analítica, va orientada a mejorar los métodos de detección quimioluminiscente, en concreto se persigue reducir el gasto de disolventes orgánicos, utilizando mayores volúmenes de los sistemas acuosos y menores volúmenes de muestra, con concentraciones inferiores. De este modo, la combinación de la QL con otras técnicas en flujo continuo, como por ejemplo el FIA, puede resultar muy ventajosa, especialmente si se tiene en cuenta que a menudo el producto quimioluminiscente tiene un tiempo de vida corto.

### 1.4.2 Fundamentos de la Quimioluminiscencia

El fenómeno de la luminiscencia basado en la emisión de radiación electromagnética (ultravioleta, visible o infrarroja cercana) por parte de moléculas o átomos, es el resultado de la transición desde un estado electrónicamente excitado a otro estado de menor energía, que normalmente es el estado fundamental.

La QL es una modalidad de luminiscencia que se define como la emisión de radiación electromagnética a partir de una reacción química. En este tipo de reacciones, alguno de los productos de reacción es obtenido en estado excitado y emite luz al regresar a su estado fundamental. Pero existen tres condiciones para que una reacción química produzca QL:

- a) Liberar la energía suficiente para producir un estado electrónico excitado.
- b) El camino de reacción debe favorecer la formación del estado electrónicamente excitado. En el caso de que la energía química se disipe en forma de calor, mediante vibraciones o rotaciones moleculares, la reacción no será quimioluminiscente.
- c) La desactivación del estado excitado ha de producirse mediante la emisión de energía radiante o la transferencia de energía a otra molécula luminiscente.

No es necesaria una fuente externa de excitación en las técnicas de QL, lo que va a permitir emplear una instrumentación bastante sencilla. Además, los sistemas de detección quimioluminiscente están caracterizados por los bajos niveles de luz de fondo, lo que reduce el ruido y permite mejorar los límites de detección.

Sin embargo, los métodos quimioluminiscentes también presentan limitaciones como:

- Dependencia de la emisión quimioluminiscente de varios factores ambientales que se deben controlar.
- Falta de selectividad.

Desde el punto de vista analítico, los procesos quimioluminiscentes pueden ser clasificados en: [14]

- a) Métodos directos: aquellos en los que el analito participa activamente en la emisión de la radiación tras ser oxidado.
- b) Métodos indirectos: cuando el analito interviene de un modo distinto en la reacción quimioluminiscente.

### 1.5 Combinación FIA-quimioluminiscencia

La combinación de ambas metodologías proporciona una serie de ventajas adicionales que la hace muy interesante resultando especialmente ventajosa desde un punto de vista analítico. Así, como se ha mencionado anteriormente, dichos sistemas hacen posible la obtención de bajos límites de detección y amplios intervalos de aplicación. Como se da la circunstancia de que los productos que generan QL suelen tener tiempos de vida muy corta, la metodología FIA se presenta como una opción especialmente adecuada para monitorizar esa señal transitoria, dada la elevada velocidad y reproducibilidad que aporta.

Entre los sistemas específicos de QL en flujo, cabe destacar la importancia de los métodos directos. Estos se caracterizan por ser una modalidad sencilla generalmente basada en un sistema bicanal, en el que la muestra es insertada en un portador adecuado confluyendo con la disolución del oxidante inmediatamente antes de la celda de flujo. De esta forma, la luz emitida por el producto de reacción es detectada de forma casi instantánea. Los procedimientos resultantes suelen poseer una sensibilidad y límites de detección habitualmente superiores a los proporcionados por los métodos indirectos.

Por otra parte, el uso de la metodología FIA permite reducir el consumo de reactivos peligrosos haciendo que los métodos analíticos desarrollados sean menos nocivos para el medio ambiente a la vez que más económicos. Así, distintos métodos FIA-QL han sido utilizados en el análisis de distintos analitos de muestras medioambientales. [15, 16]

Por ejemplo, los métodos FIA-QL han sido ampliamente usados en la determinación de plaguicidas, [18] ya que la QL es un sistema especialmente adecuado para la detección de este tipo de sustancias en el medio ambiente, dadas las bajas concentraciones en las que se suelen presentar. Por otra parte, la elevada reproducibilidad y alta velocidad de muestreo aportada por los sistemas FIA resulta muy útil para la monitorización medioambiental, debido al elevado número de muestras que es necesario procesar.

## 1.6 Uso de fuentes de irradiación

Para mejorar tanto la sensibilidad como la selectividad de los métodos, es muy común en Química Analítica, el empleo de reacciones de derivatización. En este sentido, la luz ha sido definida por algunos autores como un “reactivo ideal” [17], ya que permite reducir la cantidad de residuos químicos de laboratorio, evita la dilución de la muestra y proporciona una gran versatilidad.

Según la estructura química del analito, la luz intervendrá de diferente forma, pudiendo dar lugar a procesos de oxidación, reducción, hidrólisis, ciclación, etc. La incorporación de fotorreactores en los sistemas FIA es muy sencilla. En principio se empleaban fotorreactores de cuarzo, que permiten el paso de luz tanto visible como ultravioleta; sin embargo la fragilidad de estos últimos ha llevado a que cada vez sean menos utilizados. En la actualidad en la mayoría de los sistemas se emplea un trozo de tubo de teflón como reactor fotoquímico evitándose de esta forma los problemas de fragilidad del cuarzo. La limitada cantidad de luz que puede atravesar los microporos de sus paredes se ve compensada por los múltiples procesos de reflexión que tienen lugar en éstas, lo cual hace aumentar el tiempo de residencia de la luz en el reactor. Además existe una amplia gama de tubos de teflón de distintos diámetros y tamaños de poro.

Por otra parte, la fuente de radiación más comúnmente empleada es la lámpara de mercurio de baja presión, que presenta un máximo de emisión entorno a 254 nm, zona en la que la mayoría de moléculas presentan absorción. Exhibe así mismo una serie de ventajas adicionales como su bajo coste, mínimo desprendimiento de calor y amplia disponibilidad de tamaños y modelos.

El tiempo y condiciones de irradiación son fácilmente controlables, mediante la variación de la longitud del tubo, el caudal del flujo, las propiedades del medio en el que se encuentra el analito (por ejemplo: pH, polaridad y temperatura), distancia entre la fuente de irradiación y disolución irradiada, longitud de onda y potencia de la radiación emitida, etc. [17]

De esta forma el uso de fuentes de irradiación en sistemas FIA-QL ofrece grandes posibilidades analíticas como:

- a) Incremento del número de sustancias que pueden ser determinadas por métodos analíticos basados en QL directa.
- b) Incremento de la intensidad de luz emitida, lo que conlleva un aumento de la sensibilidad y los límites de detección.
- c) Inhibición de la emisión producida por otras sustancias quimioluminiscentes, debido a la alteración de su estructura molecular como consecuencia de la irradiación.
- d) Determinación de la influencia de pequeñas variaciones de la estructura molecular en las propiedades quimioluminiscentes.
- e) Se minimiza el consumo de muestra y de reactivos químicos, con lo que se consigue un ahorro económico y un menor impacto medioambiental.



## **2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO**



## 2.1 Objetivos

El presente proyecto final de carrera tiene los objetivos concretos que se resumen a continuación:

- Desarrollo de un nuevo método analítico para la determinación del herbicida metazaclor.
- Estudio de las características analíticas del método desarrollado, tales como intervalo de aplicación, límite de detección, repetitividad, velocidad de inserción o reproducibilidad.
- Estudio de la potencial interferencia de los iones comúnmente presentes en muestras de agua.

El método desarrollado se basa en la metodología FIA, que como antes se ha mencionado, proporciona un elevado grado de automatización además de sencillez, rapidez y seguridad para el operador, así como una buena economía de reactivos. Por lo tanto, estas técnicas son especialmente recomendables para aquellos procesos que implican la realización de un alto número de análisis, como pueden ser el control de contaminantes en muestras medioambientales.

La técnica de detección se basará en la medida de la QL del producto de oxidación de un producto de fotodegradación del metazaclor, obtenido usando luz ultravioleta. Cabe destacar que la combinación FIA-QL resulta especialmente ventajosa debido a que la cinética de las reacciones quimioluminiscentes es muy elevada y los productos obtenidos inestables.

## 2.2 Plan de trabajo

El trabajo desarrollado corresponde a las siguientes etapas:

- Revisión bibliográfica, para recabar información sobre los distintos aspectos relativos al trabajo a desarrollar, como por ejemplo los oxidantes y medios más comúnmente utilizados para la obtención de quimioluminiscencia, condiciones FIA usadas en otros trabajos y en especial información sobre el plaguicida, metazaclor.

- Ensayos previos, encaminados a determinar en primer lugar la estabilidad del plaguicida en estudio. Posteriormente, se evaluó el mejor sistema oxidante para la determinación del metazaclor, así como el efecto de la irradiación con luz UV. Se procedió también a estudiar la influencia que tiene el pH del medio en el que tiene lugar la fotodegradación del plaguicida.

-Optimización, tanto de los parámetros químicos que afectan a la reacción quimioluminiscente y a la etapa de irradiación, como de los parámetros físicos tales como temperatura y variables hidrodinámicas propias del sistema en flujo.

- Estudio de las características analíticas del sistema desarrollado, como el intervalo de aplicación, límite de detección, reproducibilidad, repetitividad, velocidad de muestreo y estudio del efecto de potenciales sustancias interferentes.

### **3. INSTRUMENTACIÓN Y REACTIVOS**



### 3.1 Reactivos

Las disoluciones preparadas en este proyecto, se realizaron con agua desionizada mediante un equipo MiliQ (Millipore, Bedford, MA, USA) provisto de un filtro de 0.22 $\mu$ m.

El metazaclor empleado pertenecía a la casa comercial FLUKA y tenía una pureza del 99.9%.

A continuación se indican los reactivos utilizados en la realización del trabajo fin de carrera agrupados según la casa comercial que los suministra:

#### **Fluka**

- B-Ciclodextrina
- Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB)

#### **J.T.Baker**

- Ácido acético
- Ácido fosfórico
- Ácido nítrico

#### **Merck**

- Tritón X-100
- 8-Hidroxiquinoleína

#### **Panreac**

- Acetona
- Ácido sulfúrico
- Nitrato de cerio (IV) y amonio
- Bicarbonato sódico
- Sulfato de cobre (II) anhidro
- Dihidrógeno fosfato sódico dihidratado
- Hidróxido sódico
- Nitrato sódico
- Nitrito sódico
- Permanganato potásico
- Peroxisulfato potásico
- Hipoclorito sódico
- Sulfito sódico anhidro

**Scharlau**

- Ácido clorhídrico
- Ácido fórmico
- Ácido perclórico
- Cloruro potásico
- Cloruro sódico
- Etanol
- Fluoresceína
- Peróxido de hidrógeno
- Cloruro de hierro (III) hexahidratado
- Sulfato de hierro (II) heptahidratado
- Sulfato de manganeso (II) monohidratado
- Hexacianoferrato potásico
- Metaperyodato potásico.
- Sulfato de magnesio heptahidratado
- Urea
- 1,4-Dioxano

**Bio-Rad**

- Dodecil sulfato sódico (SDS)

**Sigma**

- Cloruro de hexadecilpiridinio
- Clorhidrato de quinina
- Rivo flavina

**Sigma-Aldrich**

- N-bromosuccinimida

### 3.2 Aparatos

Los equipos utilizados a lo largo del estudio se citan a continuación:

-Balanza analítica modelo PI214, perteneciente a la serie Pinnacle de Denver Instruments.

-Baño de agua de Pselecta

-Ultrasonidos de Pselecta

-Luminómetro

Este aparato era de fabricación propia y consistió en una caja hermética a la luz en cuyo interior está situada la celda de flujo y el tubo fotomultiplicador.

Inmediatamente antes de la celda de flujo se realizaba la mezcla de los reactivos y la muestra mediante una confluencia en forma de T. La celda de flujo, situada frente a la ventana del tubo fotomultiplicador, consistía en un tubo de vidrio con un diámetro interno de 1.0 mm, enrollado en forma de espiral plana, presentando un diámetro total de 3 cm (Imagen 2). El tubo fotomultiplicador que se empleó fue el P30CWAD5F, tipo 9125B, de Electron Tubes que opera a 1280 V. Éste estaba conectado a un ordenador en el cual se lleva a cabo el procesamiento de la señal analítica obtenida, mediante un programa que también fue facilitado por Electron Tubes.



*Imagen 2. Celda utilizada para la detección quimioluminescente.*

-Fotorreactor

Constituido por una lámpara de mercurio de baja presión para uso germicida de 15 W (Sylvania), sobre la que se enrolla un tubo de teflón de 4 m x 0.8 mm de diámetro interno.

### **3.3 Material FIA**

El material que se empleó para realizar el montaje FIA fue el siguiente:

- Bomba peristáltica (Wilson, Modelo Miniplus 3)
- Confluencias en forma de Y y de T (Omnifit)
- Tubos de PVC-Standard (Restec)
- Tubos de teflón de 0.8 mm de diámetro interno (Omnifit)
- Tuercas y roscas (Omnifit)
- Válvula de inyección de seis puertos de presión media (Upchurch scientific, Modelo V450)

## **4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS**

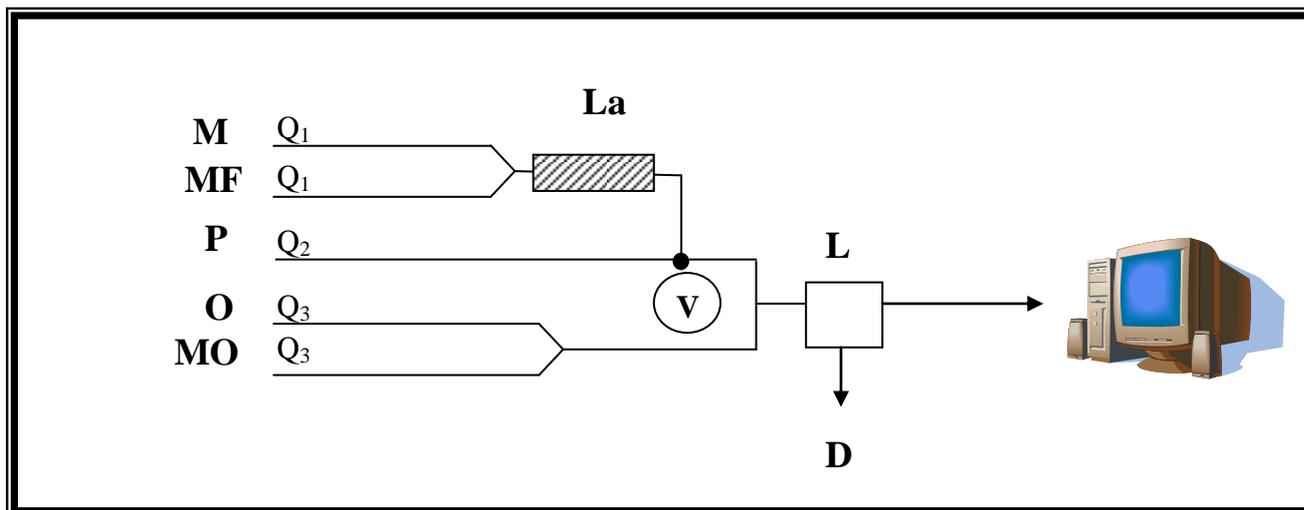


##### 4.1 Selección del montaje FIA

El metazaclor fue el plaguicida elegido, dadas sus interesantes aplicaciones mencionadas en el apartado 1.2.1 Otras circunstancias que motivaron su elección fueron su alta estabilidad y la elevada intensidad de emisión quimioluminiscente observada cuando sus fotoproductos reaccionaban con un oxidante fuerte, tal y como se observó en un barrido inicial de diversos plaguicidas.

Se estudió el metazaclor en disolución acuosa para observar su estabilidad. Como resultado de la observación de sus espectros UV-visible y de las señales quimioluminiscentes obtenidas se pudo concluir que este era estable durante al menos 1 mes. Dicha conclusión era congruente con los datos bibliográficos [8] que mencionaban su estabilidad frente a reacciones de hidrólisis a pH comprendidos entre 4 y 9.

La selección del montaje FIA más adecuado para realizar los ensayos previos se basó en los antecedentes bibliográficos [19, 20]. Se tuvo en cuenta que era necesario estudiar el efecto que la irradiación del metazaclor con luz UV podría tener sobre la obtención de fotoproductos que poseyeran unas características más adecuadas para su posterior determinación quimioluminiscente. Así, el montaje seleccionado, mostrado en la figura 2, permitía llevar a cabo la fotodegradación del plaguicida en el medio más adecuado. A continuación, en una segunda fase, el fotoproducto obtenido era oxidado para generar la señal quimioluminiscente.



$Q_1 = 1.3 \text{ mL/min}$ ;  $Q_2 = 4 \text{ mL/min}$ ;  $Q_3 = 0.9 \text{ mL/min}$

*M: Muestra; MF: Medio de fotodegradación; P: Portador; O: Oxidante; MO: Medio de oxidación;*

*La: Lámpara UV; V: Válvula de inserción; L: Luminómetro; D: Desecho.*

*Figura 2. Configuración del sistema FIA para la realización de ensayos previos.*

Como puede observarse el metazaclor era mezclado con el medio de fotodegradación, y la mezcla resultante era sometida a irradiación con una lámpara de luz UV (243 nm) (La). El fotorreactor estaba constituido por un tubo de teflón de 4 m de largo con un diámetro interior de 0.8 mm. Tras la irradiación, un volumen de 500  $\mu\text{L}$  de la disolución resultante era insertada mediante la válvula de inyección (V), en un portador, que en este caso era agua desionizada (P) circulando a un caudal de 4.0 mL/min.

Por otro lado, el oxidante (O) y el medio de oxidación (MO), circulando a un caudal de 0.9 mL/min se mezclaban en una confluencia en forma de Y. Finalmente, la disolución insertada reaccionaba con la mezcla oxidante por medio de una confluencia en forma de T justo enfrente del tubo fotomultiplicador, situado dentro del luminómetro (L). Este tubo transformaba la señal luminosa recibida en una señal eléctrica que tras ser procesada informáticamente daba lugar a un registro denominado FIA-grama. Todo el volumen de desechos era acumulado en una botella, para un posterior tratamiento selectivo de residuos.

## 4.2 Selección del sistema oxidante

La parte experimental del presente proyecto empezó con el estudio del efecto de diferentes sistemas oxidantes sobre la señal quimioluminiscente del metazaclor y/o de los fotoproductos generados tras su irradiación con luz UV.

Dado que ciertos oxidantes son inestables en contacto con el medio de oxidación requerido para que ejerzan su acción oxidante (tales como N-bromosuccinimida y  $\text{H}_2\text{O}_2$  en medio básico), se colocaron el oxidante y el medio de oxidación en recipientes distintos, siendo el montaje FIA seleccionado el que se ha mostrado anteriormente en la figura 2.

### 4.2.1 Oxidantes ensayados

Los sistemas oxidantes estudiados fueron los que se presentan en la tabla 7.

OXIDANTE	MEDIO DE OXIDACIÓN
$\text{KMnO}_4$ $2 \cdot 10^{-4}$ M	$\text{H}_2\text{SO}_4$ 1 M
$\text{Ce}(\text{NH}_4)_2(\text{NO}_3)_6$ $5 \cdot 10^{-4}$ M	$\text{H}_2\text{SO}_4$ 1 M
$\text{KIO}_4$ 0.01 M	$\text{H}_2\text{SO}_4$ 1 M
$\text{KIO}_4$ 0.01 M	NaOH 2 M
$\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 0.01 M	$\text{Ag}^+$ $2 \cdot 10^{-5}$ M/ $\text{H}_2\text{SO}_4$ 1 M
$\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 0.01 M	$\text{Ag}^+$ $2 \cdot 10^{-5}$ M/NaOH 2 M
$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ $5 \cdot 10^{-4}$ M	NaOH 2 M
N-bromosuccinimida 0.01 M	$\text{H}_2\text{SO}_4$ 1 M
N-bromosuccinimida 0.01 M	NaOH 2 M
$\text{H}_2\text{O}_2$ 0.01M	NaOH 2 M

Tabla 7. Listado de oxidantes y su medio de oxidación correspondiente.

La disolución de metazaclor utilizada para llevar a cabo la reacción tenía una concentración de 50 mg/L, y como medio para la fotorreacción, se ensayaron: H<sub>2</sub>O; H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.1 M y NaOH 0.2 M, lo que permitió evaluar el efecto del pH sobre el proceso de fotodegradación. Además, en el ensayo realizado se midió la señal con la lámpara encendida y también apagada, para poder comparar los resultados obtenidos. En ocasiones el plaguicida puede experimentar reacciones de hidrólisis básica o ácida, y eventualmente dar lugar a productos con favorables condiciones quimioluminiscentes. Por ello, el metazaclor se hizo confluír con los medios anteriormente mencionados. Los resultados obtenidos se han plasmado en la tabla 8.

4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Sistema oxidante	Medio foto-degradación	LAMP ON			LAMP OFF		
		Blanco (kHz)	Metazaclor 50 ppm (kHz)	Difer (kHz)	Blanco (kHz)	Metazaclor 50 ppm (kHz)	Difer (kHz)
KMnO <sub>4</sub> /H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.091 ±0.008	2.38 ±0.05	<b>2.29 ±0.05</b>	-	-	-
	H <sub>2</sub> O	-	1.72 ±0.10	<b>1.72 ±0.10</b>	-	-	-
	NaOH	0.095 ±0.006	4.17 ±0.18	<b>4.08 ±0.08</b>	-	-	-
Ce(IV)/H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.109 ±0.005	1.09 ±0.03	<b>0.98 ±0.03</b>	-	-	-
	H <sub>2</sub> O	0.173 ±0.017	1.07 ±0.03	<b>0.90 ±0.03</b>	-	-	-
	NaOH	0.55 ±0.06	6.34 ±0.09	<b>5.79 ±0.11</b>	-	-	-
KIO <sub>4</sub> /H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	-	-	-	-	-
	H <sub>2</sub> O	-	-	-	-	-	-
	NaOH	0.083 ±0.006	0.453 ±0.020	<b>0.370 ±0.021</b>	-	-	-
KIO <sub>4</sub> /NaOH	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.185 ±0.014	1.083 ±0.016	<b>0.898 ±0.021</b>	-	-	-
	H <sub>2</sub> O	0.111 ±0.006	1.04 ±0.08	<b>0.93 ±0.08</b>	-	-	-
	NaOH	0.106 ±0.007	0.437 ±0.011	<b>0.106 ±0.013</b>	-	-	-
K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> /Ag <sup>+</sup> /H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	-	-	-	-	-
	H <sub>2</sub> O	-	-	-	-	-	-
	NaOH	-	-	-	-	-	-

Sistema oxidante	Medio foto Degradación	LAMP ON			LAMP OFF		
		Blanco (kHz)	Metazaclor 50 ppm (kHz)	Difer (kHz)	Blanco (kHz)	Metazaclor 50 ppm (kHz)	Difer (kHz)
<b>K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>/Ag<sup>+</sup>/NaOH</b>	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	0.21 ±0.03	<b>0.21 ±0.03</b>	-	-	-
	H <sub>2</sub> O	-	0.260 ±0.016	<b>0.260 ±0.016</b>	-	-	-
	NaOH	-	0.134 ±0.022	<b>0.134 ±0.022</b>	-	-	-
<b>K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>/NaOH</b>	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.314 ±0.008	2.84 ±0.07	<b>2.53 ±0.07</b>	-	0.153 ±0.016	<b>0.153 ±0.016</b>
	H <sub>2</sub> O	0.15 ±0.03	1.76 ±0.09	<b>1.61 ±0.09</b>	-	0.138 ±0.023	<b>0.138 ±0.023</b>
	NaOH	0.116 ±0.011	1.09 ±0.07	<b>0.97 ±0.07</b>	-	0.106 ±0.021	<b>0.106 ±0.021</b>
<b>Nbromosucc/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	-	-	-	-	-
	H <sub>2</sub> O	-	-	-	-	-	-
	NaOH	-	0.189 ±0.024	<b>0.189 ±0.024</b>	-	-	-
<b>Nbromosucc/NaOH</b>	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.115 ±0.014	20.14±0.17	<b>20.03±0.17</b>	-	-	-
	H <sub>2</sub> O	0.123±0.017	1.54±0.03	<b>1.42±0.03</b>	-	-	-
	NaOH	0.177±0.023	0.71±0.03	<b>0.53±0.04</b>	-	0.082±0.003	<b>0.082±0.003</b>
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/NaOH</b>	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.111±0.008	1.134±0.024	<b>1.02±0.03</b>	-	-	-
	H <sub>2</sub> O	-	0.87±0.06	<b>0.87±0.06</b>	-	-	-
	NaOH	-	0.114±0.005	<b>0.114±0.005</b>	-	-	-

LAMP ON= Lámpara encendida. LAMP OFF = Lámpara apagada.

Tabla 8. Resultados obtenidos tras los ensayos de los sistemas oxidantes.

#### 4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Con fondo gris se han destacado aquellos sistemas oxidantes que dieron un mejor resultado. La primera conclusión que se puede apreciar es que sólo cuando la lámpara estaba encendida las señales eran apreciables, es decir era la oxidación del producto resultante de la fotodegradación del plaguicida (metazaclor) lo que producía la señal quimioluminiscente.

Este hecho era corroborado por la ausencia de señal con la lámpara apagada lo que indicaba que la oxidación directa del plaguicida no producía prácticamente ninguna emisión quimioluminiscente, a excepción del caso del ferricianuro y la N-bromosuccinimida. En ambos casos la señal observada era muy baja.

Como consecuencia de este estudio, los sistemas oxidantes preseleccionados en este ensayo, fueron aquellos que dieron una señal analítica superior a las demás, que en este caso fueron:

- $\text{KMnO}_4$   $2 \cdot 10^{-4}$  M /  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 M
- Ce (IV)  $5 \cdot 10^{-4}$  M /  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 M
- $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$   $5 \cdot 10^{-4}$  M / NaOH 2 M
- N-bromosuccinimida 0.01 M / NaOH 2 M

En todos los casos el ensayo se realizó con la lámpara encendida, debido a que los resultados obtenidos con la lámpara apagada fueron inapreciables.

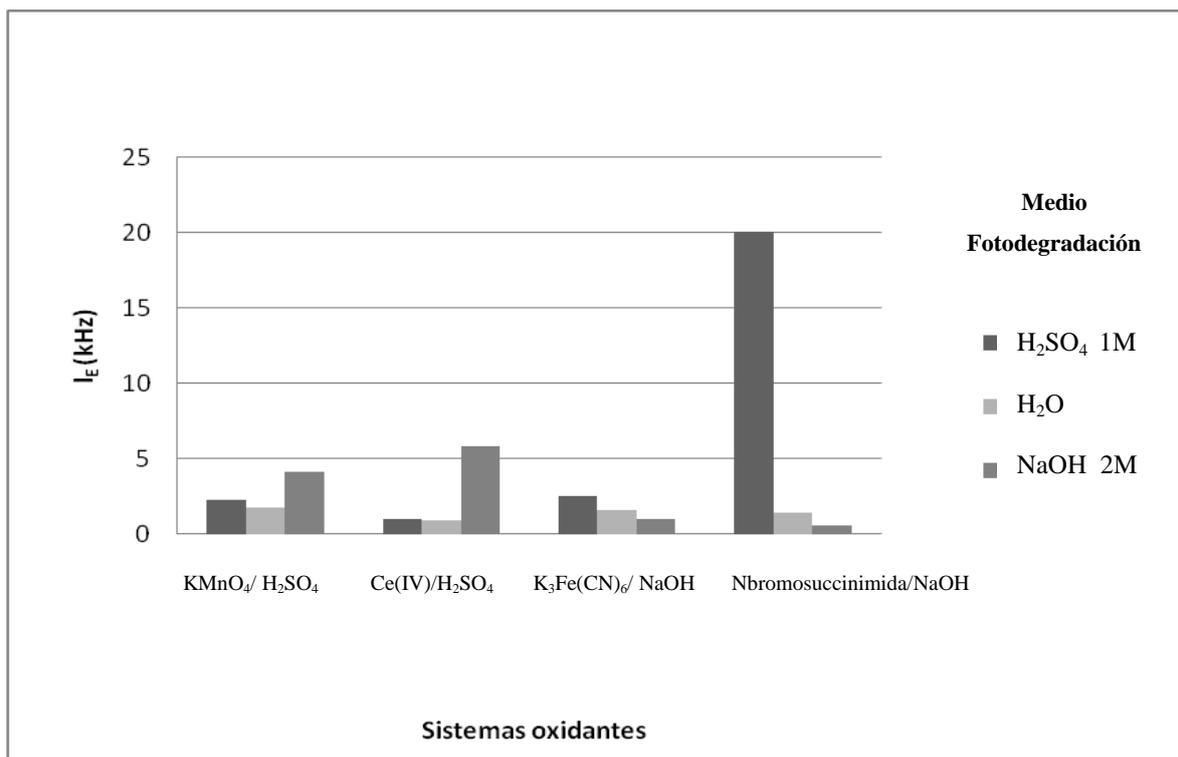


Figura 3. Estudio comparativo de los cuatro sistemas oxidantes preseleccionados.

La figura 3 representa las señales obtenidas con los distintos sistemas oxidantes en los tres medios de fotodegradación ensayados con la lámpara encendida. Como se puede observar, el sistema oxidante formado por N-bromosuccinimida/NaOH, fue el que mayor señal dio, con un valor de aproximadamente 20 kHz, en un medio de fotodegradación ácido. En los demás sistemas de oxidación la señal apenas pasó de los 5 kHz, en el mejor de los casos.

#### 4.2.2 Estudio del efecto de la concentración del sistema oxidante

Para cada uno de los cuatro sistemas oxidantes con los que se obtuvieron los mejores resultados, se procedió a realizar un estudio adicional para averiguar cuál era el sistema óptimo. En él se observó tanto el efecto de la concentración del oxidante como la del medio de oxidación. Para la realización del estudio del efecto de las concentraciones de los sistemas oxidantes, se empleó el mismo sistema y caudales representados en la Figura 2 usando una concentración de metazaclor de 10 mg/L.

-Efecto de la concentración de  $KMnO_4$ :

Para la realización del estudio del  $KMnO_4$ , el medio de fotorreacción empleado fue NaOH 0.2 M. Así mismo, el medio de oxidación utilizado fue  $H_2SO_4$  1 M y todas las pruebas fueron realizadas con la lámpara encendida.

Los resultados obtenidos tras el ensayo aparecen en la tabla 9.

<b>[<math>KMnO_4</math>] (M)</b>	<b>Blanco (kHz)</b>	<b>Señal (kHz)</b>	<b>Señal corregida (kHz)</b>
$1 \cdot 10^{-5}$	$0.095 \pm 0.006$	$0.309 \pm 0.013$	$0.214 \pm 0.014$
$5 \cdot 10^{-5}$		$0.575 \pm 0.05$	$0.477 \pm 0.014$
$1 \cdot 10^{-4}$		$0.692 \pm 0.020$	$0.59 \pm 0.03$
$2 \cdot 10^{-4}$		$0.64 \pm 0.04$	$0.54 \pm 0.04$
$5 \cdot 10^{-4}$	$0.101 \pm 0.020$	$0.465 \pm 0.024$	$0.36 \pm 0.03$

Tabla 9. Ensayo de distintas concentraciones de  $KMnO_4$

Cómo se puede observar en la tabla 9, las señales obtenidas en el intervalo estudiado fueron bajas, obteniéndose los mejores resultados para concentraciones de  $1 \cdot 10^{-4}$  y  $2 \cdot 10^{-4}$  M de  $KMnO_4$ .

-Efecto de la concentración de Ce (IV):

Las condiciones de trabajo, en cuanto a montaje y caudales fueron las mismas que para el caso del permanganato. Los resultados se muestran en la tabla 10.

<b>[Ce(IV)] (M)</b>	<b>Blanco (kHz)</b>	<b>Señal (kHz)</b>	<b>Señal corregida (kHz)</b>
$5 \cdot 10^{-4}$	$0.32 \pm 0.03$	$1.00 \pm 0.03$	$0.68 \pm 0.04$
$7 \cdot 10^{-4}$	$0.312 \pm 0.009$	$1.238 \pm 0.018$	$0.926 \pm 0.020$
$2 \cdot 10^{-3}$	$0.37 \pm 0.03$	$3.24 \pm 0.03$	$2.87 \pm 0.04$
$5 \cdot 10^{-3}$	$0.41 \pm 0.03$	$5.63 \pm 0.08$	$5.42 \pm 0.09$
$6 \cdot 10^{-3}$	$0.285 \pm 0.024$	$5.49 \pm 0.11$	$5.21 \pm 0.11$
$8 \cdot 10^{-3}$	$0.35 \pm 0.14$	$6.42 \pm 0.23$	$6.1 \pm 0.3$
0.01	$0.48 \pm 0.06$	$6.0 \pm 0.3$	$5.5 \pm 0.3$

Tabla 10. Estudio de la concentración de Ce (IV).

Como puede observarse en la tabla 10, los mejores resultados fueron obtenidos con una concentración de  $8 \cdot 10^{-3}$  M de Ce (IV), con un valor de  $6.1 \pm 0.3$  kHz.

-Efecto de la concentración de  $K_3Fe(CN)_6$ :

En este caso, también las condiciones del sistema fueron las mismas, pero los medios de fotorreacción y oxidación eran distintos, es decir, la concentración de metazaclor siguió siendo de 10 mg/L; el medio de fotorreacción empleado era  $H_2SO_4$  0.1 M, y el medio reacción de oxidación (antes de la confluencia) NaOH 2 M. En este caso la lámpara también permaneció encendida durante el estudio.

Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla.

<b>[Fe(CN)<math>_6^{3-}</math>] (M)</b>	<b>Blanco (kHz)</b>	<b>Señal (kHz)</b>	<b>Señal corregida (kHz)</b>
$1 \cdot 10^{-5}$	0.154±0.006	0.84±0.04	0.69±0.04
$2 \cdot 10^{-5}$	0.123±0.013	0.838±0.019	0.715±0.023
$5 \cdot 10^{-5}$	0.120±0.011	1.05±0.03	0.93±0.03
$7 \cdot 10^{-5}$	0.118±0.008	0.715±0.04	0.59±0.04
$2 \cdot 10^{-4}$	0.091±0.014	0.87±0.06	0.78±0.06
$5 \cdot 10^{-4}$	0.090±0.010	0.65±0.04	0.56±0.04

*Tabla 11. Resultados del estudio de la concentración de  $Fe(CN)_6^{3-}$*

Como se observa en dicha tabla una concentración de  $Fe(CN)_6^{3-}$  de  $5 \cdot 10^{-5}$  M, fue la que dio mejores resultados, siendo la señal obtenida de  $0.93 \pm 0.03$  kHz.

- Efecto de la concentración de N-bromosuccinimida.

Para el estudio del efecto de la concentración de N-bromosuccinimida, las condiciones del sistema fueron exactamente las mismas que para el caso del ferricianuro.

Los resultados obtenidos fueron los que aparecen reflejados en la tabla 12.

[N-bromosuccinimida] (M)	Blanco (kHz)	Señal (kHz)	Señal corregida (kHz)
$3 \cdot 10^{-3}$	1.04±0.12	7.1±1.6	6.1±1.6
$4 \cdot 10^{-3}$	1.18±0.09	7.9±1.6	6.7±1.6
$5 \cdot 10^{-3}$	1.12±0.08	9.3±1.6	8.2±1.6
$6 \cdot 10^{-3}$	0.74±0.14	10.2±0.7	9.5±0.7
$7 \cdot 10^{-3}$	1.05±0.09	9.2±0.3	8.2±0.3

*Tabla 12. Resultados del estudio de la concentración de N-bromosuccinimida.*

Tras observar la tabla 12, se pueden destacar el alto valor obtenido con N-bromosuccinimida, en comparación con los anteriores sistemas oxidantes. En este caso, la señal más alta ( $9.5 \pm 0.7$  kHz) fue obtenida con una concentración de  $6 \cdot 10^{-3}$  M de N-bromosuccinimida.

Como conclusión final de los estudios anteriores, se descartó el uso de permanganato y ferricianuro por los bajos valores en la señal obtenida con ellos. Así pues, se procedió a realizar estudios adicionales del Ce (IV), y de N-bromosuccinimida con el fin de descartar uno de ellos.

-Estudio adicional con el Ce (IV):

Para estudiar como incidía la acción oxidante del Ce (IV) sobre la señal analítica, se cambió el medio en el cual la oxidación del plaguicida tenía lugar. De este modo, se ensayaron distintos ácidos, ya que en muchos casos los aniones que forman parte de su composición pueden formar complejos con el Ce (IV), alterándose de esta forma su potencial redox y por tanto, incidiendo de manera significativa en su acción oxidante. Las sustancias ensayadas fueron: ácido sulfúrico, ácido perclórico, ácido nítrico, ácido clorhídrico y ácido acético, todos ellos con una concentración 1 M antes de confluir con una disolución de Ce

(IV). El estudio se llevó a cabo realizando inserciones de 5 mg/L de metazaclor que previamente confluían con NaOH 0.2 M. Todo el estudio fue realizado con la lámpara encendida, y los caudales empleados fueron los expuestos en la figura 2.

Los resultados obtenidos como consecuencia de este estudio fueron los tabulados a continuación en la tabla 13.

<b>Medio (1M)</b>	<b>Blanco (kHz)</b>	<b>Señal (kHz)</b>	<b>Diferencia (kHz)</b>
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.39±0.03	3.5±0.3	3.1±0.3
HClO <sub>4</sub>	0.517±0.024	3.43±0.14	2.91±0.14
HNO <sub>3</sub>	0.49±0.03	3.80±0.06	3.31±0.07
HCl	0.35±0.03	1.57±0.11	1.22±0.11
HAc	0.278±0.018	1.57±0.06	1.29±0.16

*Tabla 13. Influencia del medio de oxidación en la acción del Ce(IV).*

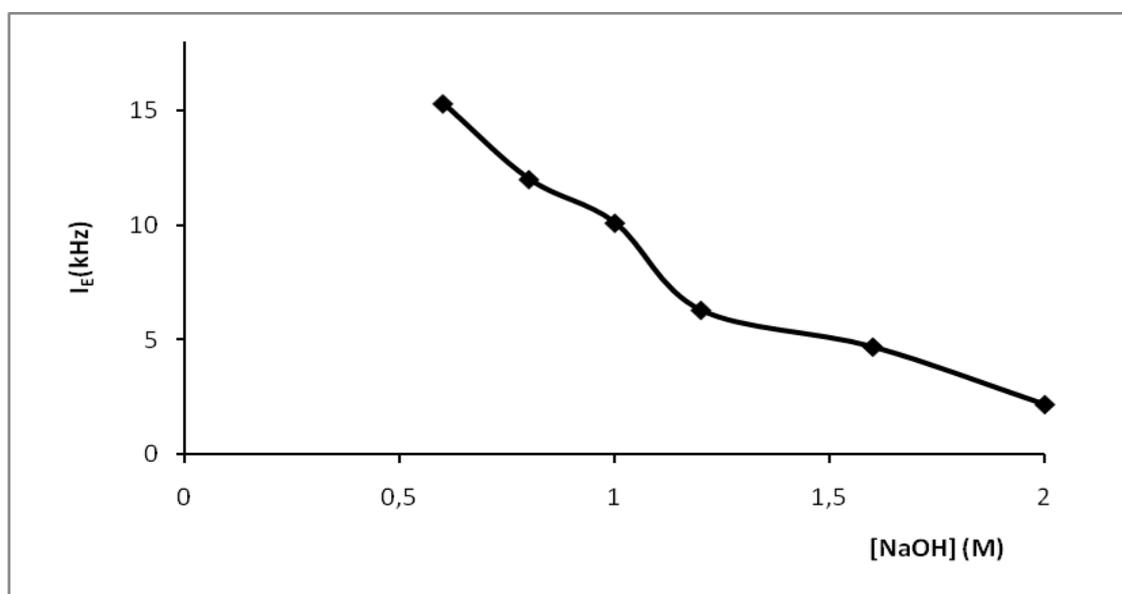
Como se observa en dicha tabla, al variar de medio de oxidación solo se consiguió una pequeña mejora en la señal, con respecto a la obtenida con el ácido sulfúrico, cuando se utilizó ácido nítrico. En los demás casos la intensidad de emisión quimioluminiscente disminuyó, siendo este descenso muy significativo en el caso de los ácidos clorhídrico y acético.

-Estudio adicional con la N-bromosuccinimida:

En este caso, lo primero que se hizo fue variar la concentración de NaOH usada como medio de oxidación en el intervalo comprendido entre 2 y 0.6 M. Se usó N-bromosuccinimida en una concentración de  $6 \cdot 10^{-3}$  M por ser con este valor con el que se obtuvo una señal quimioluminiscente más elevada (tabla 12). Los resultados alcanzados aparecen reflejados en la tabla 14 y en la gráfica 1.

[NaOH] (M)	Blanco (kHz)	Señal 1ppm (kHz)	Señal corregida (kHz)
0.6	3.39±0.03	18.7±0.4	15.3±0.4
0.8	2.23±0.13	14.2±0.24	12.0±0.3
1	1.51±0.07	11.6±0.4	10.1±0.4
1.2	1.29±0.04	7.6±0.8	6.3±0.8
1.6	0.82±0.24	5.54±0.20	4.7±0.3
2	0.27±0.04	2.46±0.16	2.19±0.16

Tabla 14. Influencia del medio de oxidación en la acción de la N-bromosuccinimida.



Gráfica 1. Efecto de la basicidad sobre la acción oxidante de la N-bromosuccinimida.

Como se puede observar la señal aumentaba de forma considerable al disminuir la concentración de NaOH. Así, en el mejor de los casos el valor obtenido para este oxidante llegaba a ser más de 5 veces superior a la obtenida con Cerio (IV), por lo que se descartó el uso de este último. Así mismo, se seleccionó el valor de 0.6 M de hidróxido sódico para seguir trabajando con la N-bromosuccinimida. Se evitó ensayar concentraciones menores a fin de evitar que el ácido sulfúrico empleado como medio de fotodegradación, neutralizara completamente al hidróxido sódico y no se pudiera alcanzar el necesario medio básico para que la N-bromosuccinimida ejerciera su acción oxidante. A este respecto conviene hacer notar que en la tabla 8 se puede observar que cuando se usó como medio de oxidación ácido sulfúrico, la señal obtenida con un medio de fotodegradación ácido fue nula.

A continuación, y usando como medio de oxidación NaOH 0.6 M, se volvió a estudiar el efecto de la concentración del oxidante sobre la señal. Gracias a la mejora obtenida en la sensibilidad, el estudio se efectuó en este caso sobre una disolución que contenía tan sólo 1 mg/L de metazaclor. Los resultados obtenidos se exponen en la tabla 15 y en la gráfica 2.

[N-bromosuccinimida] (M)	Blanco (kHz)	Señal 1ppm (kHz)	Señal corregida, (kHz)
$2 \cdot 10^{-3}$	1.58±0.08	6.16±0.14	4.58±0.16
$4 \cdot 10^{-3}$	1.83±0.07	6.30±0.23	4.47±0.24
$6 \cdot 10^{-3}$	1.65±0.07	5.65±0.13	4.00±0.15
$8 \cdot 10^{-3}$	1.58±0.09	5.63±0.10	4.05±0.13
$1 \cdot 10^{-2}$	1.27±0.08	5.72±0.12	4.45±0.14

*Tabla 15. Influencia de la concentración de N-bromosuccinimida sobre la intensidad de emisión quimioluminiscente.*

La señal se mantuvo bastante estable en el intervalo de concentraciones estudiado. No obstante, como la QL obtenida fue un poco más elevada para  $4 \cdot 10^{-3}$  M, se seleccionó dicha concentración de N-bromosuccinimida, para seguir trabajando.

### 4.3 Estudio de sensibilizadores

Existe una amplia variedad de sustancias que pueden actuar como fotosensibilizadores y sustancias potenciadoras de la QL de otras especies. Según cuál sea su función, los sensibilizadores se pueden clasificar en cuatro grupos: [21]

- Compuestos que promueven la fotodegradación.
- Sustancias que generan o estabilizan radicales libres, favoreciendo mecanismos de fotodegradación radicalarios.
- Compuestos que proporcionan medios organizados o rigidez estructural al medio, incrementando el tiempo de vida promedio de las especies emisoras. Estos compuestos protegen a la molécula del entorno evitando pérdidas de energía por mecanismos distintos a la emisión quimioluminiscente, tales como pérdidas en forma de calor por colisión entre moléculas.
- Fluoróforos con rendimientos cuánticos elevados. En estos casos, como producto de la reacción de oxidación, se genera una especie en estado excitado, y ésta puede transferir su energía al sensibilizador, que será a continuación el responsable final de la emisión de luz.

Los métodos de QL indirecta basados en el empleo de sensibilizadores pueden permitir aumentar el rendimiento cuántico de la reacción quimioluminiscente, y en ocasiones proporcionar una mayor estabilidad química. La utilización de sensibilizadores presenta también otras ventajas adicionales. Así por ejemplo, éstos se pueden seleccionar de forma que se alcance el mejor compromiso entre las longitudes de onda de emisión, estabilidad química y rendimiento cuántico.

Para estudiar el efecto que tenía sobre la señal analítica la utilización de sensibilizadores, se seleccionaron las sustancias y concentraciones expuestas a continuación:

Quinina  $10^{-4}$  M

Sulfito  $10^{-4}$  M

8-hidroxiquinoleína  $10^{-4}$  M

Etanol 5 %

2-propanol 20 %

Dioxano 10 %

Ácido fórmico 0.5 %

Acetona 1 %

Acetonitrilo 20 %

Acetona 1 % + Acetonitrilo 20 %

SDS 2.9 % y 0.145 %

Hexadecilpiridinio 0.4 % y 0.02 %

CTAB 0.2 % y 0.02 %

Triton X-100 0.4 % y 0.02 %

$\beta$ -ciclodextrina 3 % y 0.15 %

Fluoresceína  $10^{-4}$  M

Riboflavina  $10^{-4}$  M

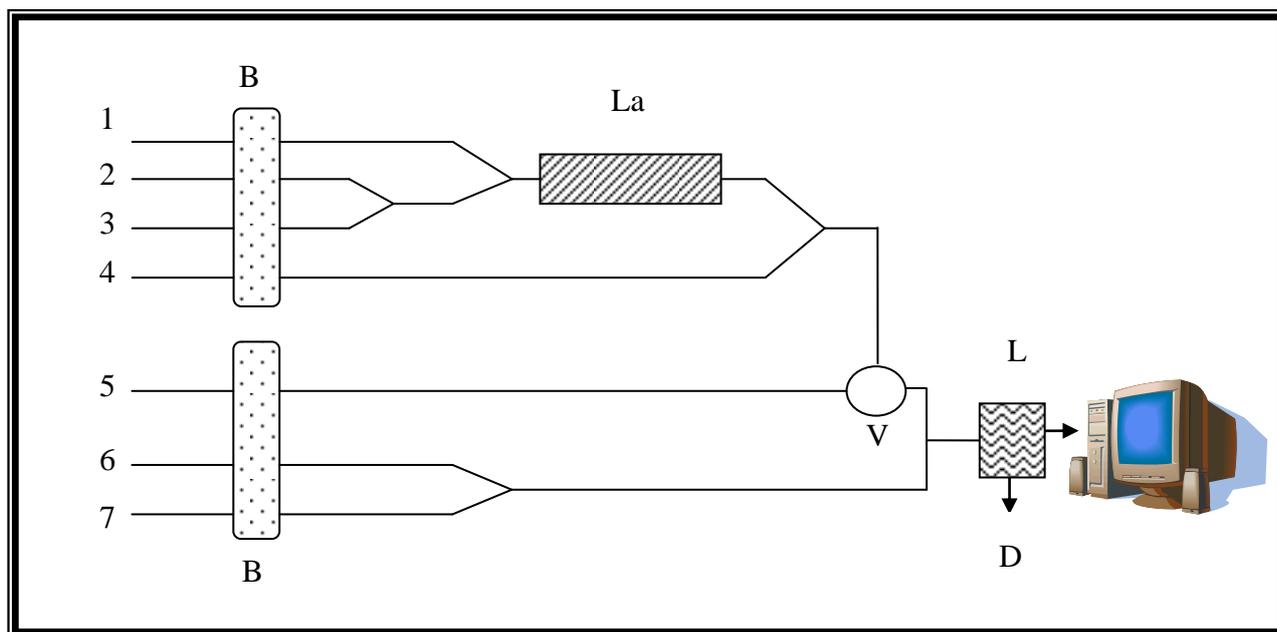
Amarillo de Acridina  $10^{-4}$  M

Naranja de Acridina  $10^{-4}$  M

Eosina  $5 \cdot 10^{-6}$  M

Rodamina 6B  $5 \cdot 10^{-6}$  M

Para la realización de este estudio se empleó el sistema FIA que se muestra en la figura 4.



- 1: Metazaclor 1mg/L (1.3 mL/min)
- 2: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.2 M (0.65 mL/min)
- 3: Sensibilizador/H<sub>2</sub>O (0.65 mL/min)
- 4: Sensibilizador/H<sub>2</sub>O (0.65 mL/min)
- 5: H<sub>2</sub>O (4 mL/min)
- 6: N-bromosuccinimida 4·10<sup>-3</sup> M (0.9 mL/min)
- 7: NaOH 0.6 M (0.9 mL/min)

*B: bomba peristáltica; La: lámpara; V: válvula de inserción; L: luminómetro; D: Desecho.*

*Figura 4. Sistema FIA utilizado en el estudio de sensibilizadores.*

Como se puede observar, el montaje FIA estaba compuesto por 7 canales, 2 bombas peristálticas y hasta 5 confluencias. La principal motivación en utilizar un sistema tan complejo era el poder evaluar el efecto del sensibilizador tanto en la fotodegradación y oxidación conjuntamente, como en la reacción de oxidación únicamente. También hay que hacer notar que en ocasiones, el sensibilizador ensayado no era estable en el medio de fotodegradación elegido, por ello convenía adicionarlo justo antes de que la fotodegradación tuviera lugar.

Por ello, como se puede observar en los canales 3 y 4 se podía introducir agua o sensibilizador alternativamente. De esta forma, cuando por 3 se introducía agua y por 4 sensibilizador, se evaluaba el efecto de éste último sobre la oxidación únicamente, ya que el sensibilizador nunca pasaba por la lámpara y por tanto en la irradiación de la muestra este no estaba presente.

Por el contrario, cuando se introducía el sensibilizador por 3, se estudiaba el efecto que el sensibilizador tenía sobre la fotodegradación y la oxidación conjuntamente, ya que en ese caso el sensibilizador sí estaba presente en la irradiación del plaguicida. En esos casos por 4 se introducía agua con la finalidad de que la concentración del sensibilizador se mantuviera constante cuando tenía lugar la oxidación. Los resultados de este estudio aparecen en la tabla 16.

4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Sensibilizador	Blanco (O) (kHz)	Señal (O) (kHz)	$\Delta$ (%) (O)	Blanco (F+O) (kHz)	Señal (F+O) (kHz)	$\Delta$ (%) (F+O)
Quinina $10^{-4}$ M	0.118±0.024	1.01±0.03	-79.0	1.73±0.03	2.57±0.06	-80.2
<b>Sulfito <math>10^{-4}</math> M</b>	0.444±0.010	6.26±0.10	<b>+37.3</b>	0.303±0.015	3.30±0.12	-29.2
8-hidroxiquinoleína $10^{-4}$ M	0.50±0.03	1.27±0.12	-81.8	0.10±0.03	0.51±0.03	-90.3
Etanol 5 %	-	0.112±0.020	-100	-	0.10±0.03	-100
2-propanol 20 %	-	0.13±0.03	-100	-	0.087±0.008	-100
Dioxano 10 %	-	0.08±0.04	-100	-	0.080±0.013	-100
Ácido fórmico 0.5 %	0.146±0.016	0.426±0.022	-93.1	-	0.17±0.03	-100
Acetona 1 %	0.283±0.015	0.85±0.05	-82.2	2.86±0.09	2.35±0.10	-100
Acetonitrilo 20 %	1.07±0.08	1.54±0.05	-89.3	0.350±0.020	0.76±0.03	-90.7
Acetona 1 % + Acetonitrilo 20 %	0.171±0.014	0.45±0.12	-88.2	5.2±0.4	4.47±0.09	
SDS 2.9 %	0.15±0.13	0.50±0.05	-85.5	0.19±0.04	0.22±0.04	-98.8
SDS 0.145 %	0.52±0.03	2.19±0.11	-40.8	0.15±0.13	0.313±0.023	-94.3
Hexadecilpiridinio 0.4 %	3.15±0.04	2.54±0.05	-100	58.6±0.6	54.4±2.0	-100
Hexadecilpiridinio 0.02 %	0.38±0.07	1.36±0.03	-59.3	1.45±0.05	1.75±0.04	-87.6
CTAB 0.2 %	0.69±0.13	1.48±0.15	-75.5	0.81±0.24	1.30±0.24	-84.8
CTAB 0.02 %	0.67±0.11	3.20±0.23	-28.6	0.488±0.024	1.14±0.04	-81.4
Triton X-100 0.4 %	0	0.61±0.13	-81.5	52±4	49±4	-233
Triton X-100 0.02 %	0	1.06±0.06	-52.9	0.461±0.08	0.55±0.16	-96
$\beta$ -ciclodextrina 3 %	0	0.156±0.012	-93.9	0	0.151±0.011	-94.1
$\beta$ -ciclodextrina 0.15 %	0.32±0.09	1.181±0.015	-73.3	0.145±0.014	0.386±0.017	-92.5
Fluoresceína $10^{-4}$ M	157.6±2.2	158.0±2.0	-91.5	286±4	272±3	*
Riboflavina $10^{-4}$ M	10.40±0.20	10.65±0.10	-89.4	53±2	42±3	*
Amarillo de Acridina $10^{-4}$ M	0.332±0.03	1.23±0.06	-77.2	0.75±0.04	1.45±0.03	-82.2
Naranja de Acridina $10^{-4}$ M	7.4±0.3	7.50±0.10	-97.6	5.19±0.10	5.51±0.18	-92.5
Eosina $5 \cdot 10^{-6}$ M	12.2±2.0	12.3±0.3	-97.7	11.3±1.4	10.4±0.9	*
Rodamina 6B $5 \cdot 10^{-6}$ M	1.7±0.5	4.1±0.3	-20.3	2.6±0.4	4.3±0.4	-43.5

\*El blanco daba más señal que el plaguicida.

Tabla 16. Efecto de los sensibilizadores sobre la señal analítica

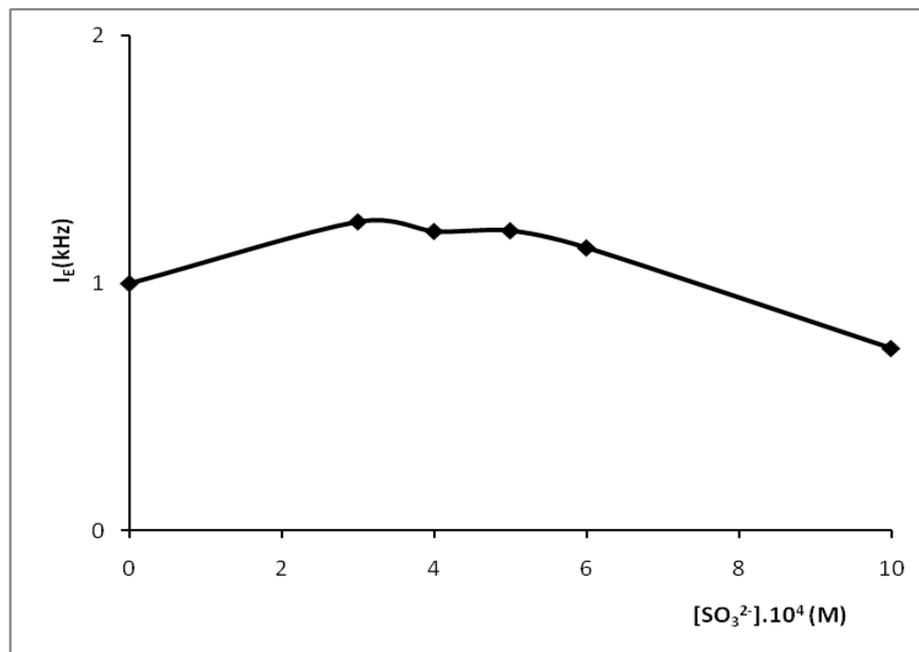
Donde:

$\Delta (\%)(O)$  = Incremento obtenido en la señal cuando el sensibilizador actuaba solo sobre la reacción de oxidación.

$\Delta (\%)(F+O)$  = Incremento obtenido en la señal cuando el sensibilizador actuaba sobre las reacciones de oxidación y fotodegradación.

Como se puede observar, tan solo el uso de sulfito permitía incrementar la intensidad de la emisión quimioluminiscente obtenida. Además, dicho efecto se observaba cuando esta sustancia se hacía confluír con el plaguicida tras su paso por la lámpara, es decir la sensibilización tenía lugar durante el proceso de oxidación del producto de fotodegradación.

Como la mejora obtenida en la señal era muy limitada, y con la finalidad de evaluar si merecía la pena el uso de dicho sensibilizador, se estudió cómo variaba ese incremento de señal con la concentración de sulfito, obteniéndose los resultados que aparecen reflejados en la Gráfica 2.



Gráfica 2. Estudio del efecto sensibilizador del sulfito.

#### 4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Como se puede observar en dicha gráfica, no se consiguió en ningún caso una mejora apreciable. Debido a ello y a la inestabilidad de esta sustancia, especialmente propensa a la oxidación por el oxígeno atmosférico, se descartó el uso de esta sustancia como sensibilizador.

## 4.4 Optimización de las variables más importantes

### 4.4.1 Estudio del pH

El pH podía influir tanto en el proceso de fotodegradación como en la reacción de oxidación, por lo que se introdujeron sistemas amortiguadores de pH en el canal por el que circulaba el medio de oxidación con el fin de poder estudiar el efecto del pH sobre ambos procesos de manera independiente. De esta forma se ensayaron distintos sistemas que mantuvieran el pH en valores básicos, ya que la N-bromosuccinimida necesita de este medio para poder ejercer su acción oxidante. Concretamente los sistemas amortiguadores, pH y concentraciones ensayados fueron los siguientes:

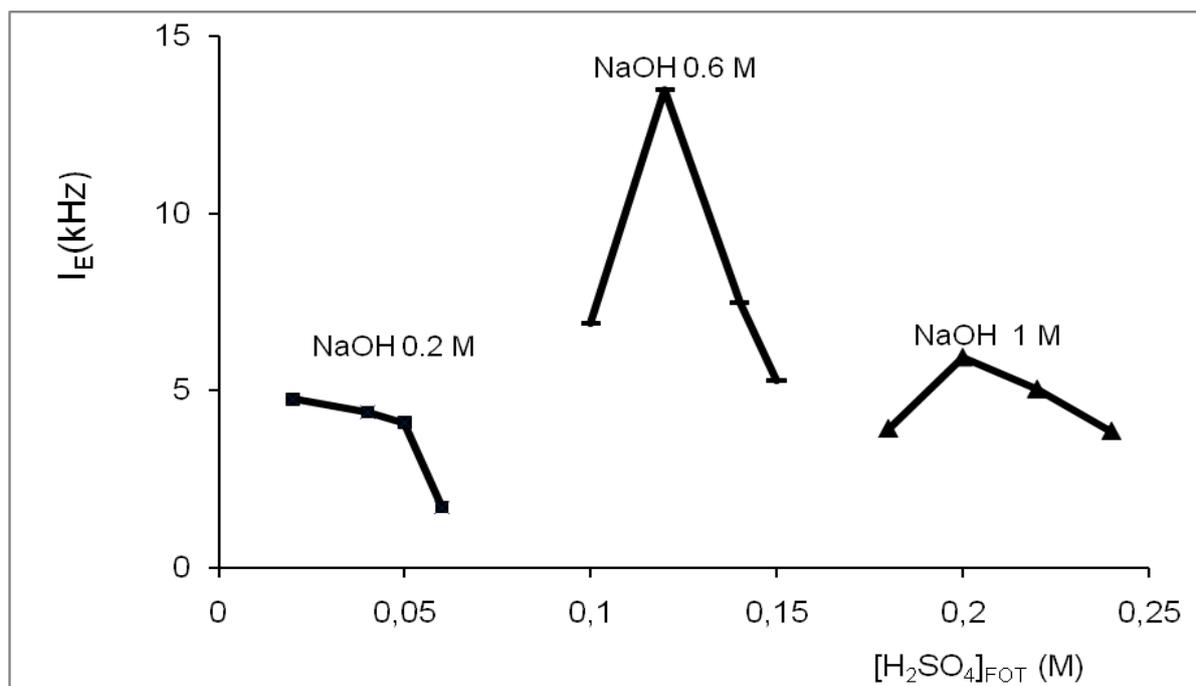
$\text{H}_3\text{BO}_3/\text{H}_2\text{BO}_3^-$  (pH 9.2) (1 M),  $\text{CO}_3^{2-}/\text{HCO}_3^-$  (pH 9.93) (1 M),  $\text{PO}_4^{3-}/\text{HPO}_4^{2-}$  (pH 12.48) (1 M) y Glicina/NaCl/NaOH (pH 11, 12.5 y 13.3) (0.5 M).

Como se puede observar la concentración ensayada para las disoluciones tampón fue alta para que así se pudiera amortiguar el medio ácido, proporcionado por el ácido sulfúrico, necesario para la fotodegradación del metazaclor.

Los resultados obtenidos finalmente demostraron que no era posible la utilización de esos tampones debido al efecto interferente de las altas concentraciones de aniones en los sistemas amortiguadores ensayados.

Debido a dicha limitación, el estudio de la influencia de pH sobre el proceso de oxidación se llevó a cabo ensayando tres concentraciones distintas de NaOH en el canal que confluía con el oxidante: 0.2, 0.6 y 1 M. Estas concentraciones eran lo suficientemente elevadas como para neutralizar el ácido sulfúrico que acompañaba al metazaclor, y asegurar así que el medio de oxidación era básico

A su vez, para cada una de estas concentraciones se ensayaron distintas concentraciones de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  en el canal que confluía con el plaguicida, con el fin de evaluar la influencia que tenía la acidez sobre la fotodegradación del metazaclor. A este respecto, cabe tener en cuenta que la acidez proporcionada por el ácido sulfúrico tenía un doble efecto, así además de influir en el proceso de fotodegradación del plaguicida, modulaba la basicidad presente en el proceso de oxidación. Los resultados obtenidos se muestran en la gráfica 3:

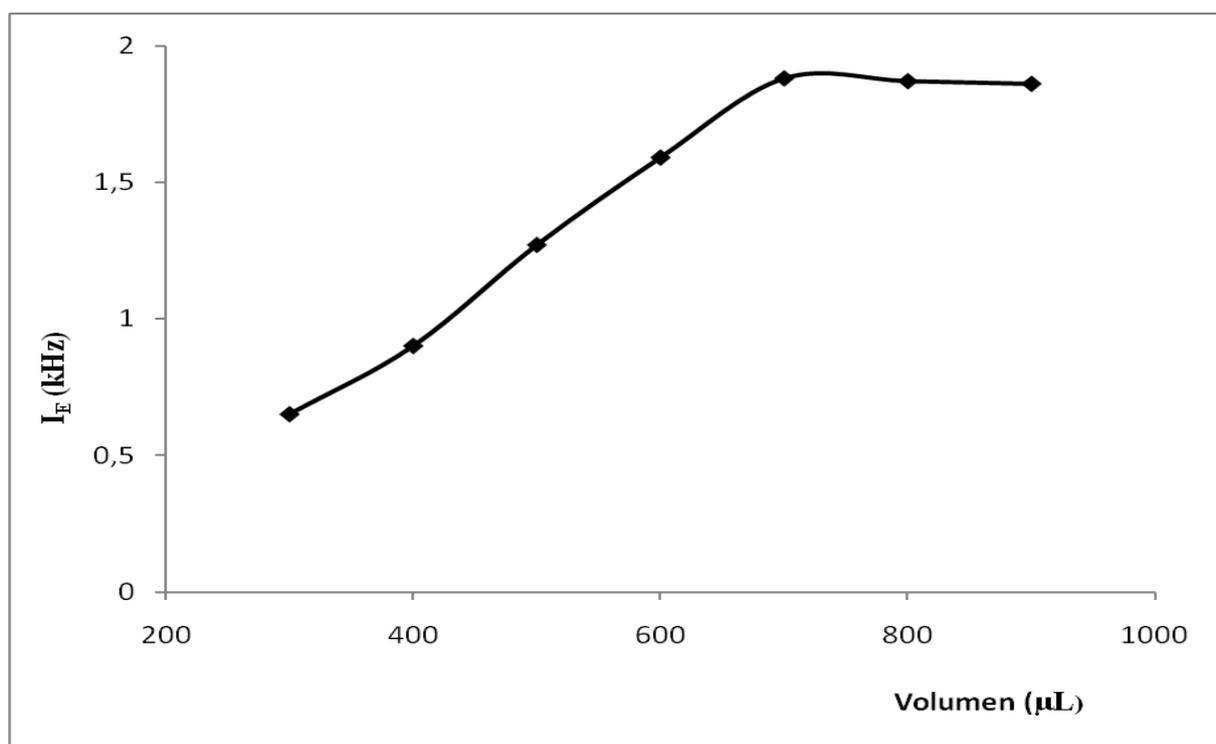


Gráfica 3. Influencia del pH sobre la señal analítica.

Como se puede observar, el pH ejercía una notable influencia sobre la señal quimioluminiscente obtenida. Los mejores resultados se obtuvieron cuando por el canal del medio de oxidación circulaba NaOH 0.6 M y por el canal que confluía con el plaguicida lo hacía una concentración de  $H_2SO_4$  de 0.12 M. Fueron por tanto, dichas condiciones las seleccionadas para continuar trabajando.

#### 4.4.2 Influencia del volumen de muestra insertada

A continuación se estudió el efecto del volumen de muestra insertada variando esta en el intervalo comprendido entre 300 y 900  $\mu\text{L}$ . No se probaron volúmenes menores, ya que como se puede observar en la gráfica 4 abajo expuesta, para valores inferiores a los 700  $\mu\text{L}$  se observaba un descenso acusado en la señal obtenida, lo que probablemente era debido a que la celda no quedaba completamente llena con la mezcla quimioluminiscente. Por otra parte, tampoco se ensayaron volúmenes superiores a 900  $\mu\text{L}$ , ya que a partir de 700  $\mu\text{L}$  se observaba una estabilización en la intensidad de emisión quimioluminiscente obtenida. Además, la inserción de volúmenes excesivamente grandes podría provocar un incorrecto mezclado del metazaclor- $\text{H}_2\text{SO}_4$  con el  $\text{NaOH}$  presente en el portador, no alcanzándose de este modo el valor óptimo de pH para la oxidación, lo que provocaría una bajada de señal y la aparición de picos dobles.

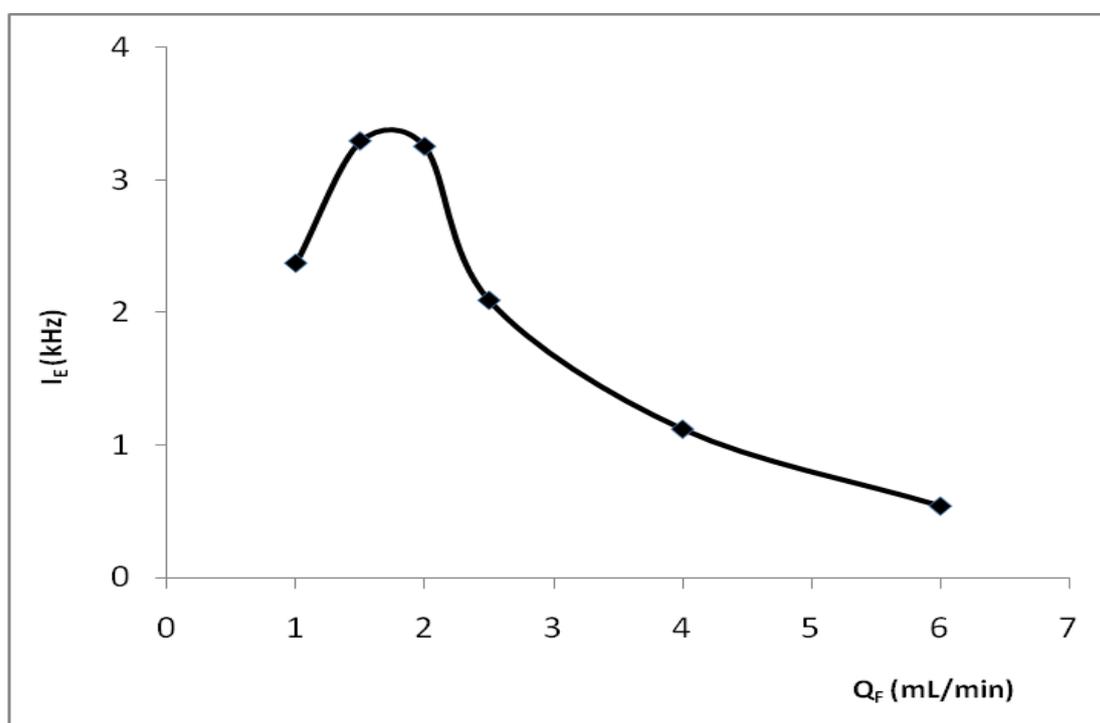


*Gráfica 4. Señal obtenida según el volumen de muestra insertado.*

Una vez establecido como valor óptimo para el volumen insertado 700  $\mu\text{L}$ , se procedió a estudiar el efecto de los tiempos de fotodegradación y oxidación sobre la señal analítica.

#### 4.4.3 Efecto del tiempo de fotodegradación/ oxidación

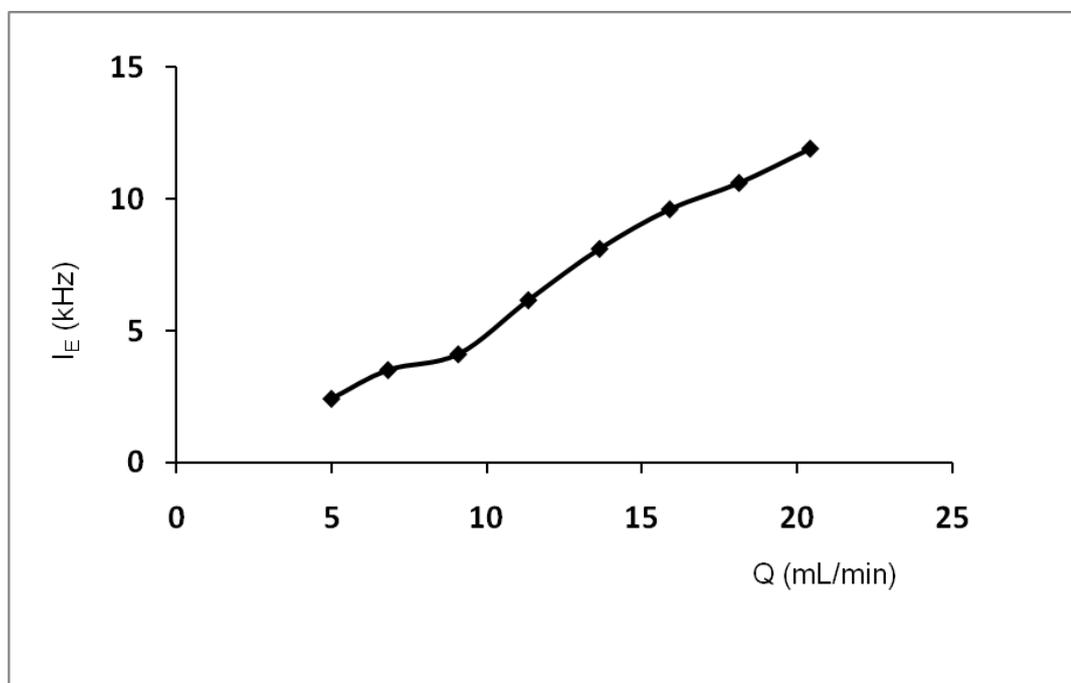
El estudio de estos 2 parámetros suele ser muy importante en sistemas quimioluminiscentes. Esto es debido a que los intermedios de reacción suelen tener tiempos de vida media cortos. Para estudiar el efecto del tiempo de fotodegradación se varió el caudal conjunto de plaguicida y medio de fotodegradación (ácido sulfúrico) en el intervalo comprendido entre 1 y 6 mL/min, lo cual correspondía a tiempos de irradiación comprendidos entre 120 y 20 segundos, manteniendo constante la relación entre ambos caudales al 50 %. Los resultados obtenidos para una concentración de 100  $\mu\text{g/L}$  de metazaclor se muestran en la gráfica 5:



Gráfica 5. Estudio del efecto del tiempo de fotodegradación.

Se puede apreciar que en efecto la influencia de este parámetro sobre la señal analítica era muy acusada. El valor óptimo se obtuvo para los valores de caudal comprendidos entre 1.5 y 2 mL/min, observándose un descenso brusco de la señal para caudales superiores, lo cual ponía de manifiesto que el producto fotodegradado era inestable. Con el fin de conseguir la mayor velocidad de muestreo posible se seleccionó un valor de 2 mL/min (1.65 y 0.35 mL/min para plaguicida y medio de fotodegradación respectivamente) para seguir trabajando, lo cual correspondía a 60 s de irradiación.

Por otra parte, para evaluar el efecto que tenía el tiempo de oxidación lo que se hizo fue variar el caudal conjunto de portador y el sistema oxidante en el intervalo comprendido entre 5 y 20.5 mL/min, manteniendo constante la relación entre ambos caudales (2:1). Como se puede observar en la gráfica 6 abajo expuesta, la señal analítica proporcionada por 100 µg/L de metazaclor aumentaba conforme lo hacía el caudal, revelando que la reacción de oxidación era muy rápida y la emisión luminiscente tenía lugar en muy poco tiempo. Se seleccionó como valor óptimo el de 20.5 mL/min (13.5 mL/min para el portador y 7 mL/min para el sistema oxidante). Como puede observarse, este valor era el máximo de los estudiados, no se ensayaron caudales mayores con el fin de evitar que saltaran las juntas del montaje FIA utilizado como consecuencia de las grandes presiones que se generarían.



*Gráfica 6. Resultados del estudio del caudal en la reacción de oxidación.*

#### **4.4.4 Estudio de la temperatura**

La última variable física ensayada fue la temperatura, estudiándose su efecto sobre los procesos de fotodegradación y oxidación. Para ello se seleccionaron tres temperaturas: ambiente (23 °C), 44 °C y 60 °C. Para estudiar el efecto sobre la fotodegradación se alargó el

#### 4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

camino de la mezcla plaguicida-  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 M mediante un trozo de tubo de 2 m de longitud y 0.8 mm de diámetro interno. Tanto este tubo enrollado en espiral como el bucle de muestra se sumergieron en un baño termostatzado de agua. Para evaluar el efecto sobre la reacción de oxidación se procedió del mismo modo con el canal por el que circulaba la mezcla resultante de los canales de oxidante y medio de oxidación, y con el canal por el que circulaba el portador calentándolo en ese caso antes de la entrada a la válvula. El incremento en la sensibilidad obtenido en las etapas previas de optimización permitió disminuir la concentración de metazaclor empleada en este estudio hasta un valor de 20  $\mu\text{g/L}$ . Los resultados obtenidos tras restar la señal proporcionada por el blanco se recogen en la tabla 17.

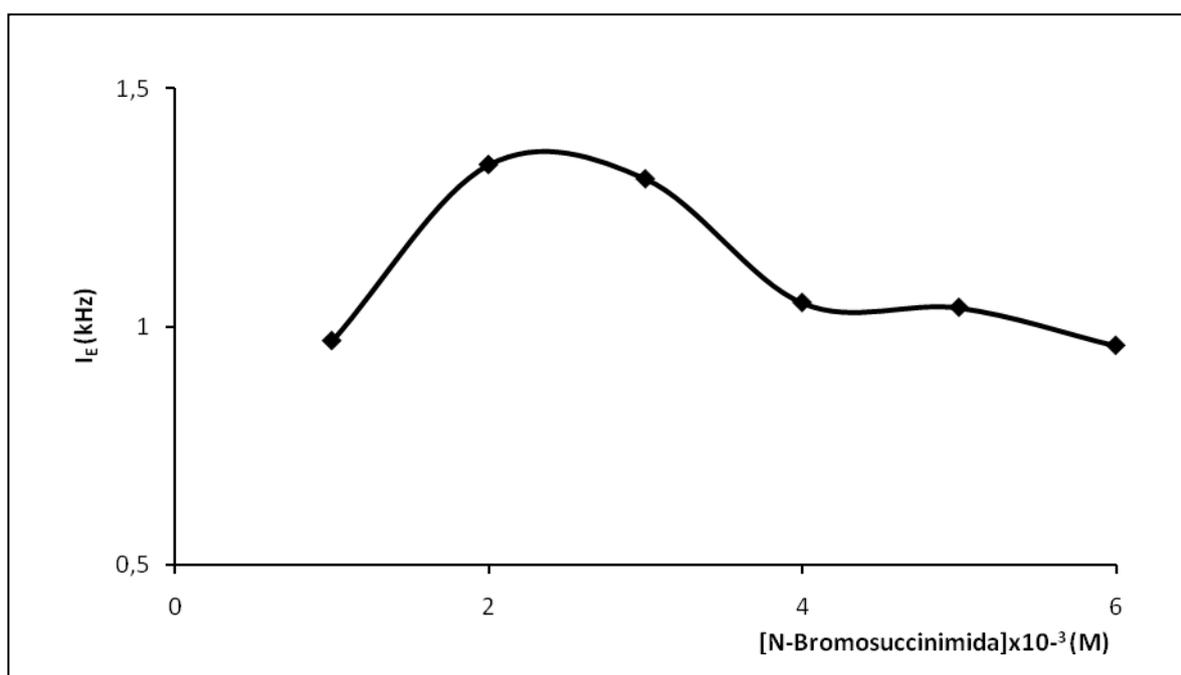
<b>T (°C)</b>	<b>Fotodegradación (kHz)</b>	<b>Oxidación (kHz)</b>
23	1.23±0.07	0.88±0.06
44	1.13±0.06	0.96±0.10
60	1.31±0.16	0.96±0.07

*Tabla 17. Influencia de la temperatura en los procesos de fotodegradación y oxidación del metazaclor.*

Como puede observarse el efecto de la temperatura sobre la señal obtenida era despreciable en ambos casos, por lo que se optó por continuar trabajando a temperatura ambiente.

#### 4.4.5 Estudio de la concentración de oxidante

Para finalizar con la etapa de optimización se procedió a realizar un estudio sobre el efecto que tenía la concentración de oxidante sobre la señal analítica, dada la gran importancia que suele tener este parámetro en los procesos quimioluminiscentes. Este estudio ya se había efectuado previamente, pero tras haber prácticamente finalizado el proceso de optimización algunas de las condiciones iniciales habían cambiado sustancialmente, y ello podría haber provocado que la concentración de oxidante previamente seleccionada ya no fuera la óptima.

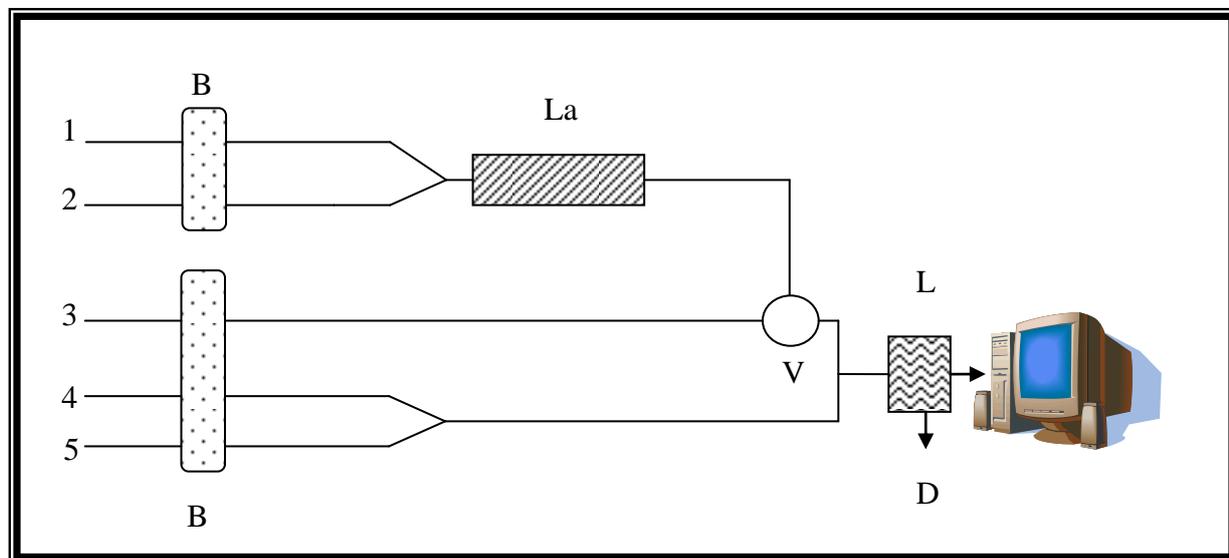


*Gráfica 7. Reoptimización de la concentración de oxidante.*

De los resultados obtenidos se seleccionó  $2 \cdot 10^{-3}$  M como valor óptimo para la concentración de N-bromosuccinimida, ya que la señal observada fue la más alta, como se puede comprobar en la gráfica 7.

#### 4.4.6 Montaje FIA finalmente seleccionado.

Después de realizar los estudios previos, el montaje FIA y condiciones seleccionadas fueron las que se muestran a continuación en la figura 5.



- 1: Metazaclor (1.65 mL/min)
- 2: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.2 M (0.35 mL/min)
- 3: H<sub>2</sub>O (15.5 mL/min)
- 4: N-bromosuccinimida  $2 \cdot 10^{-3}$  M (3.5 mL/min)
- 5: NaOH 0.6 M (3.5 mL/min)

*B: bomba peristáltica; La: lámpara; V: válvula de inserción; L: luminómetro; D: desecho.*

*Figura 5. Montaje FIA propuesto para llevar a cabo la determinación del metazaclor.*



## **5. CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DEL MÉTODO PROPUESTO**



### 5.1 Intervalo de linealidad

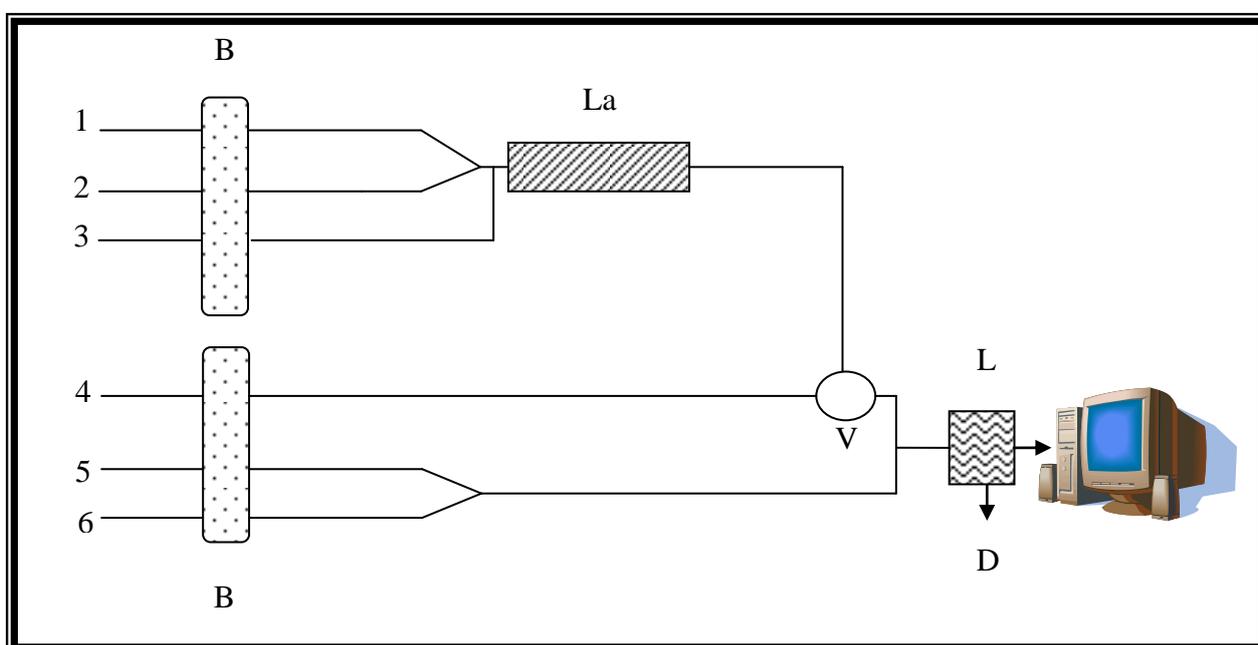
Para establecer el intervalo de aplicación del método se fue aumentando y disminuyendo progresivamente las concentraciones de plaguicida ensayadas hasta que se observó que se perdía la linealidad. Como consecuencia de dicho estudio se halló que el intervalo de linealidad estaba comprendido entre 5 y 150  $\mu\text{g/L}$  de metazaclor. Así mismo, se encontró que la ecuación que relacionaba la concentración de metazaclor ( $c$ ), expresada en  $\mu\text{g/L}$ , con la intensidad de emisión quimioluminiscente ( $I_E$ ), expresada en kHz, era:

$$I_E = 0.102 c + 0.047$$

## 5.2 Estudio de interferentes

A continuación se estudió el efecto interferente que sobre la señal analítica tenían aquellos iones que se presentan con mayor frecuencia y abundancia en las aguas naturales. También se ensayó el efecto de la urea, por ser un compuesto orgánico que suele presentarse con frecuencia en aguas contaminadas como consecuencia de la actividad agrícola-ganadera.

Para llevar a cabo dicho estudio se utilizó el siguiente montaje.



1. Metazaclor 100  $\mu\text{g/L}$  (0.825 mL/min)
2. Interferente/ $\text{H}_2\text{O}$  (0.825 mL/min)
3. Acido sulfúrico 0.2 M (0.35 mL/min)
- 4:  $\text{H}_2\text{O}$  (13.5 mL/min)
- 5: N-bromosuccinimida  $2.10^{-3}$  M (3.5 mL/min)
- 6: NaOH 0.6 M (3.5 mL/min)

*B: bomba peristáltica; La: lámpara; V: válvula de inserción; L: luminómetro; D: desecho.*

*Figura 6. Montaje FIA empleado para realizar el estudio del efecto de interferentes.*

## 5. CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DEL MÉTODO PROPUESTO

Como se puede observar, lo que se hizo fue desdoblar el canal por el que circulaba el plaguicida en 2 canales, para poder hacer circular por uno de ellos a la sustancia cuyo efecto interferente se quería estudiar, mientras que por el otro circulaba el metazaclor. Con el fin de que el tiempo de irradiación no variara, el caudal conjunto de ambos canales se mantuvo en el mismo valor usado hasta ahora para el canal por el que circulaba el plaguicida. Con este fin, fue necesario sustituir la goma hasta entonces usada para hacer circular el plaguicida, por otras dos gomas con la mitad de diámetro interno.

Para llevar a cabo el estudio de interferentes se seleccionó una concentración de metazaclor situada en la mitad inferior del intervalo de aplicación (50 µg/L). La concentración de interferente ensayada se fue disminuyendo gradualmente hasta que la señal obtenida en ausencia de interferente se viera modificada en un porcentaje inferior al 5 %. En la tabla 18, abajo expuesta aparecen los distintos interferentes ensayados, así como la concentración máxima para la que el error cometido en la determinación de metazaclor fue inferior al mencionado 5 %.

<b>Interferente</b>	<b>Concentración (mg/L)</b>	<b>Error (%)</b>
Cl <sup>-</sup>	100	-3.9
H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	100	-4.3
Ca <sup>2+</sup>	100	-4.2
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0.2	+1.2
Mg <sup>2+</sup>	10	+4.9
K <sup>+</sup>	2000	+0.1
CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup>	5	+0.5
Urea	2	+2.5
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	50	-1.9

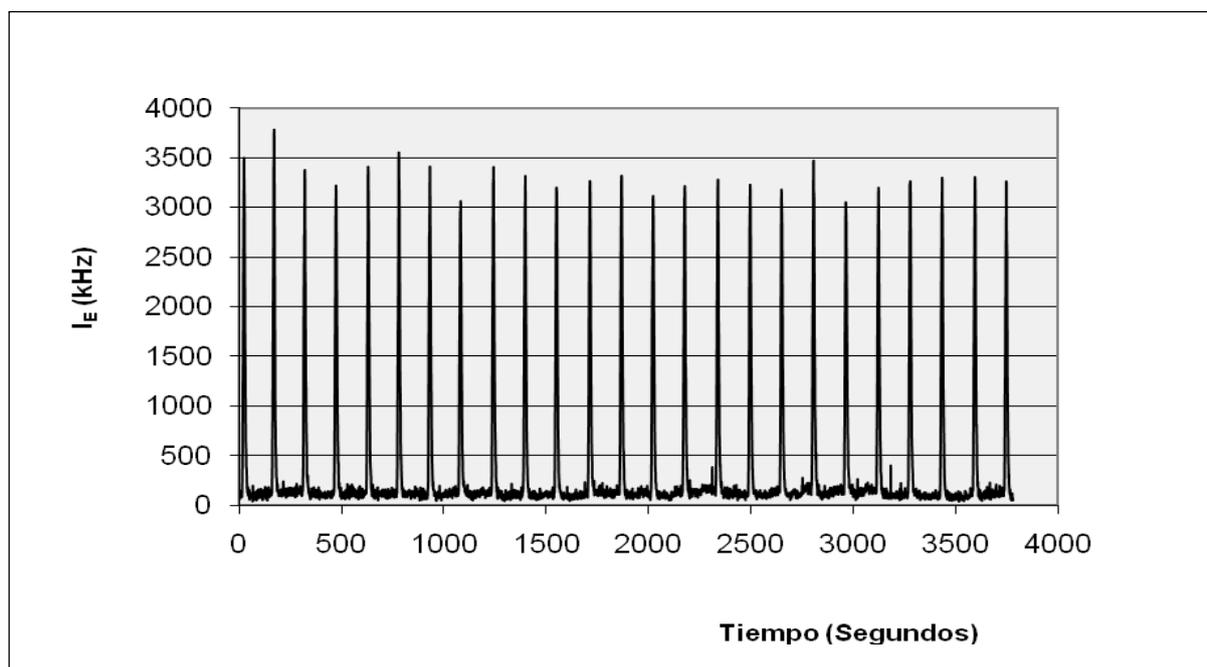
*Tabla 18. Estudio de interferencias.*

Como se puede observar, la interferencia debida al  $\text{NO}_3^-$  era la más importante. El origen de esta interferencia se debe probablemente a la fotorreducción de esta especie, que tiene lugar en la etapa de irradiación con la luz UV, para producir  $\text{NO}_2^-$ . Esta especie es reductora y puede consumir parte de la N-bromosuccinimida necesaria para la oxidación del producto de fotodegradación del metazaclor, causando de este modo una disminución en la señal obtenida.

En cuanto a los cationes ensayados, el calcio y magnesio suponían una seria interferencia. Cabe destacar a este respecto, que dichos iones se pueden encontrar en concentraciones relativamente elevadas en aguas duras. Como consecuencia de ello, para poder aplicar el método a este tipo de aguas sería conveniente la eliminación previa de estos iones. Ello se podría realizar mediante resinas de intercambio iónico o mediante sistemas de extracción en fase sólida lo que permitiría a su vez separar otros iones como el cloruro y bicarbonato que suelen presentarse en concentraciones elevadas.

### 5.3 Determinación de la velocidad de muestreo y repetitividad

Para evaluar la velocidad de muestreo y la repetitividad del método se realizaron 25 inserciones consecutivas de una disolución que contenía 50  $\mu\text{g/L}$  de metazaclor. Como resultado de esta experiencia se obtuvo que la velocidad de muestreo era de 95 inserciones/h y la desviación estándar relativa de la señal obtenida para esos 25 picos fue del 4.8 %. En la figura 7 pueden observarse los picos utilizados para efectuar dichos cálculos.



*Figura 7. Determinación de la velocidad y repetitividad.*

#### **5.4 Límite de detección**

Finalmente se calculó el límite de detección para el método propuesto. Para ello se fueron insertando concentraciones crecientes de metazaclor hasta que la altura de pico obtenido fue superior a la señal proporcionada por el blanco más tres veces su desviación estándar absoluta. El valor así obtenido para el límite de detección fue de 0.5 µg/L.

## **6. CONCLUSIONES**



Se ha desarrollado un método analítico para la determinación del herbicida metazaclor en muestras de aguas naturales mediante la combinación de la metodología FIA y la detección quimioluminiscente. Para llevar a cabo la determinación se incorporó en el montaje utilizado una lámpara de luz ultravioleta. De esta forma, la señal analítica obtenida correspondió a la QL producida, a partir de un producto de fotodegradación del metazaclor, tras su oxidación con N-bromosuccinimida en medio básico.

El trabajo presentado demostró la eficacia de la combinación de las técnicas antes mencionadas, al permitir la determinación del metazaclor de forma sencilla y rápida (95 inserciones/h), en un intervalo comprendido entre 5 y 150  $\mu\text{g/L}$ . Así mismo, el método propuesto presentó una elevada sensibilidad (límite de detección de 0.5  $\mu\text{g/L}$ ) al a vez que un reducido consumo de reactivos.



## **7. BIBLIOGRAFÍA**



[1] Pesticides Industry Sales and Usage. 1992-1993 Market Estimates US Environmental Protection Agency.pdf. <http://www.epa.gov/> (consultado en enero 2011) Página de la EPA (Environmental Protection Agency)

[2] WHO. Public Health impact of Pesticides Used in Agriculture. Ginebra: 1990. <http://www.who.int/heli/risks/en/> Página oficial de World Health Organization (WHO) (consultado en enero 2011).

[3] K. Atreya: “Pesticides and the environment”. Presentación pdf. University of life sciences. Noruega. 2008.

[4] B.D. Benerjee: “The influence of various factors on immune toxicity assessment of pesticide chemical”, *Toxicology Letters*, 107, 21-31, 1999.

[5] M. Maroni, A. Fait, C. Colosio: “Risk assessment and management of occupational exposure to pesticides”. *Toxicology Letters*, 107, 145-153. 1999.

[6] S. Vega: “Toxicología I: evaluación epidemiológica de riesgos causados por agentes químicos ambientales”. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, OPS, OMS. 1985.

[7] [http://www2.ine.gob.mx/sistemas/plaguicidas/descargas/caracteristicas\\_fyq\\_plaguicidas.pdf](http://www2.ine.gob.mx/sistemas/plaguicidas/descargas/caracteristicas_fyq_plaguicidas.pdf) Instituto Nacional de Ecología de México (consultado en julio 2010).

[8] <http://agrochemicals.iupac.org>. Página de la IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) (consultado en enero 2011).

[9] [http://www.kingtaichem.com/pro\\_h\\_METAZACHLOR.htm](http://www.kingtaichem.com/pro_h_METAZACHLOR.htm). Kingtai Chemicals Corporation (consultado en enero 2011).

[10] K.K. Stewart, G.R. Beecher, P. Hare: “Rapid analysis of discrete samples: the use of nonsegmented continuous flow”, *Anal. Biochem*, 70, 167-173, 1976.

[11] J. Ruzicka, E.H. Hansen: "Flow injection analysis I. New concept of fast continuous flow analysis", *Anal. Chim. Acta*, 78, 145-147, 1975.

[12] M. Valcárcel, M.D Luque de Castro: "Análisis por Inyección en Flujo: una importante innovación metodológica en Química Analítica", *Química Analítica*, Vol. I, 4, 201-217. 1983

[13] A.M. García Campaña, W.R. Baeyens: "Chemiluminescence in Analytical Chemistry" Marcel Dekker, New York, 2001.

[14] N. Barnett, B. Hindson, P. Jones, T. Smith: "Chemically induced phosphorescence from manganese (II) during the oxidation of various compounds by manganese (III), (IV) and (VII) in acidic aqueous solutions" *Anal. Chim. Acta*, 451, 181-188, 2002.

[15] X. Wang, M.L. Liu, X.L. Cheng, J.M. Jin. "Flow-based luminescence-sensing methods for environmental water analysis". *Trends. Anal. Chem.* 28(1): 75-87. 2009

[16] A.F Dunec, M. Cheregi, Martínez, J. Martínez Calatayud, J.V. García Mateo, H.Y. Enein: "Flow Injection Methods of Analysis for Waters. II. Organic Pollutants". *Crit. Rev. Anal. Chem.* 33(1): 57-58, 2003.

[17] M. Catalá Icardo, J. Martínez Calatayud: "Photo-Induced Luminescence", *Crit. Rew. Anal. Chem*, 38, 118-130, 2008.

[18] J.L. López-Paz, M. Catalá-Icardo: "Analysis of pesticides by flow injection analysis coupled with chemiluminescent detection". *Analytical Letters* in press. 2011.

[19] A. Blasco López : "Desarrollo de un procedimiento en continuo para la determinación del oxasulfurón mediante la utilización de procesos de fotodegradación y determinación quimioluminiscente". Proyecto Fin de Carrera. Gandia, 2006.

[20] S. E. Benavent Oltra : "Desarrollo de un nuevo procedimiento para la determinación del plaguicida ziram mediante la utilización de técnicas de análisis en flujo continuo y detección quimioluminiscente". Proyecto Fin de Carrera. Gandía 2007.

- [21] M. Catalá Icardo, J.V. García Mateo, M. Fernández Lozano, J. Martínez Calatayud:  
“Enhanced flow-injection–chemiluminometric determination of sulphonamides by online  
photochemical reaction”, *A nal. Chim. Acta*, 499, 57–69, 2003.