



DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA
UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA
FACULTAD DE CIENCIAS

TESIS DOCTORAL

**“NUEVOS MÉTODOS LUMINESCENTES PARA LA
DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS EN AGUAS”**

Antonia Bautista Sánchez

Badajoz, 2001

“NUEVOS MÉTODOS LUMINESCENTES PARA LA DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS EN AGUAS”

por

Antonia Bautista Sánchez

Directores:

Dr. D. Arsenio Muñoz de la Peña Castrillo
Catedrático del Departamento de Q^{ca} Analítica
Facultad de Ciencias, Universidad de Extremadura.

y

Dra. Dña. M^a del Carmen Mahedero García
Profesora Titular del Departamento de Q^{ca} Analítica
Facultad de Ciencias, Universidad de Extremadura.

Memoria de Investigación presentada para optar al Grado de Doctor dentro del Programa de Doctorado “Análisis Químico y Control de Alimentos”, bienio 1996-1998, impartido por el Departamento de Química Analítica de la Universidad de Extremadura.

Edita: Universidad de Extremadura
Servicio de Publicaciones
c/ Pizarro, 8
Cáceres 10071
Correo e.: publicac@unex.es
<http://www.pcid.es/public.htm>

OBJETO DE LA TESIS DOCTORAL

El objeto de esta Memoria de Investigación es el estudio analítico, mediante técnicas luminiscentes, de herbicidas de gran uso en agricultura, como Diurón, I soproturón, Linurón, Neburón, 2,4-D, 2,4,5-T, MCPA, MCPP y Propanil, así como la aplicación al desarrollo de nuevos métodos de análisis para la determinación de los mismos en aguas y la resolución de sus mezclas.

PRESENTACIÓN DE CAPÍTULOS

El Capítulo I , se subdivide en cuatro secciones en las que se introduce al lector en el campo de los herbicidas, los medios organizados, la luminiscencia molecular y la fluorescencia inducida fotoquímicamente.

En el Capítulo II , se describen los reactivos y aparatos empleados así como los programas informáticos de los que se han hecho uso.

En el Capítulo III , se han establecido métodos luminiscentes para la determinación de los pesticidas objeto de estudio en esta Memoria.

Finalmente, en el Capítulo IV, se proponen métodos cromatográficos para la separación de mezclas de los herbicidas, a la vez que se aplican a la determinación de éstos en agua de distinta procedencia.

**Esta Tesis Doctoral ha sido financiada por la Consejería de Educación,
Ciencia y Tecnología de la Junta de Extremadura
(DOE 19/3/97)**

I.A. - HERBICIDAS

I.A.1.- Plaguicidas: clasificación

I.A.2.- La mala hierba y su papel

I.A.3.- Perjuicios causados por las malas hierbas

I.A.4.- Causas del desarrollo de los herbicidas

I.A.5.- Características de los herbicidas. Métodos de análisis

I.A.5.1.- Fitohormonas

g Ácido 1-naftilacético

g Naftalenacetamida

g Derivados de ácidos

I.A.5.2.- Combinaciones nitrogenadas

g Fenilureas

g Propanil

I.A.6.- Terminología específica

I.A.7.- Bibliografía

I.A.1.- PLAGUICIDAS: CLASIFICACIÓN

Con el nombre de plaguicidas o pesticidas se denominan a aquellas sustancias que combaten los parásitos de los cultivos, del ganado, animales domésticos así como del hombre y el medio ambiente que lo rodea.

Habitualmente, el producto activo de un plaguicida es obtenido por la industria química en un grado de pureza que oscila entre el 75 y el 98%, siendo el resto impurezas de fabricación. El producto técnicamente puro no suele emplearse de modo directo en agricultura, de ahí que se utilicen las denominadas formulaciones que contienen la materia activa más o menos diluida en un soporte sólido o disolvente líquido, junto con sustancias coadyuvantes que mejoran su acción.

Los plaguicidas van a tener diversos usos, así, **plaguicidas de uso fitosanitario o productos fitosanitarios**, destinados a su utilización en el ámbito de la sanidad vegetal y aquellos otros, de análoga naturaleza, destinados a combatir malezas u otros organismos indeseables en áreas no cultivadas.

Plaguicidas de uso ganadero, destinados a su utilización en el entorno de los animales o en las actividades estrechamente relacionadas con su explotación.

Plaguicidas para uso en la industria alimentaria, utilizados en tratamientos externos de transformación de vegetales, de productos de origen animal y de sus envases, así como los destinados al tratamiento de locales, instalaciones o maquinarias relacionadas con la industria alimentaria.

Plaguicidas de uso ambiental, empleados en operaciones de desinfección, desinsectación y desratización en locales públicos o privados, establecimientos fijos o móviles, medios de transporte e instalaciones.

Plaguicidas para uso en higiene personal, aquellos preparados útiles para la aplicación directa sobre el hombre y **plaguicidas para uso doméstico**, cualquiera de los definidos anteriormente, autorizados expresamente para que puedan ser aplicados por personas no especialmente cualificadas en viviendas y otros locales habitados.

Para que un pesticida sea aceptable para su uso como tal, debe reunir las siguientes cualidades:

- Efectividad en la destrucción de la plaga contra la que se aplica.
- Selectividad en su acción sobre su objetivo, en cuyo caso no puede perjudicar la flora o fauna beneficiosa.
- Economía, proporcionando mayores beneficios que los gastos que ocasiona su uso.
- Seguridad, en el sentido de no suponer un peligro para la salud del hombre ni de los animales domésticos, ni representar una elevada fitotoxicidad.
- Estabilidad durante el tiempo necesario para el desarrollo de su acción.
- Posibilidad de formulación a los efectos de aplicabilidad, estabilidad y efectividad.

En España, el peligro general de los plaguicidas para las personas se recoge en la *"Reglamentación Técnico Sanitaria para la Fabricación, Comercialización y Utilización de Plaguicidas"*, aprobada por RD 3349/1983 que en su artículo 3º clasifica a los plaguicidas, atendiendo a los posibles riesgos contra la salud humana, en: Muy tóxicos, tóxicos, nocivos y de baja peligrosidad.

En función del criterio usado, son varias las posibilidades de clasificación de los pesticidas. Estos criterios pueden ser peligrosidad, forma de acción, especie

sobre la que actúan y naturaleza del plaguicida:

g Atendiendo a su **peligrosidad**, los pesticidas pueden ser muy tóxicos, tóxicos, nocivos, irritantes, explosivos, cancerígenos, mutagénicos, y peligrosos para el medio ambiente.

g Si se atiende a la **forma en que actúan** pueden ser plaguicidas de contacto, en los que la acción tiene lugar a través del contacto directo con la planta. Sistémicos, en los que es "ingerido" por la planta e incorporado a la savia que lo distribuye. Por último, otros plaguicidas actúan al incorporarse a la planta por "inhalación".

g Atendiendo a la **especie sobre la que actúan**, los plaguicidas pueden ser acaricidas, bactericidas, fungicidas, herbicidas, insecticidas, helicidas, rodenticidas, repelentes de aves y antibióticos. La acción de estos últimos es la de inhibir el desarrollo de microorganismos.

g De todas las posibles clasificaciones, tal vez, la más interesante desde el punto de vista de esta Memoria es la realizada en base a la **naturaleza** del plaguicida, en la que se aceptan tres grandes grupos: plaguicidas inorgánicos, orgánicos y biológicos.

- Bajo la denominación de plaguicidas inorgánicos, se engloban aquellos que son derivados de arsénico, azufre, cobre, flúor, cianhídrico y aceites minerales.

-Dentro de los plaguicidas orgánicos se encuentran varios tipos: organoclorados, organofosforados, carbamatos, tiocarbamatos, derivados de urea y triacinas y derivados vegetales, como nicotina, roterona o piretrinas.

- Finalmente, en el grupo de los plaguicidas biológicos encontramos los reguladores del crecimiento, fitohormonas, atrayentes, repelentes y depredadores de la plaga que se combate.

Dado que esta Memoria se centra en el estudio de una determinada serie de herbicidas, a continuación, haremos una breve introducción de los parásitos a los que van dirigidos estos herbicidas, las malas hierbas, así como la necesidad de eliminarlas.

I.A.2.- LA MALA HIERBA Y SU PAPEL

Botánicamente, la *"mala hierba"* no existe. Cuando llamamos "mala hierba" a una especie vegetal, tan sólo expresamos una opinión, ya que es "mala" porque dificulta el crecimiento de las plantas de cultivo. De hecho, una planta cultivada en un lugar puede ser una mala hierba en otro; tal es el caso del trigo sarraceno que se siembra para forraje en Polonia. Ciertas plantas pertenecientes a la misma familia botánica, y a veces, al mismo género, pueden ser, unas, malas hierbas y otras, plantas cultivadas como sucede con la avena y la avena loca o la zanahoria y la zanahoria silvestre. Esta identidad biológica, que puede existir entre las malas hierbas y las plantas cultivadas, permite calibrar las dificultades de la escarda química, a la que se exige destruir las primeras y respetar las segundas [1].

Otros términos, de origen latino, son empleados como sinónimos de "malas hierbas": son las plantas adventicias, comensales o miesícolas.

I.A.3.- PERJUICIOS CAUSADOS POR LAS MALAS HIERBAS

Existe una competición activa entre la planta cultivada y las malas hierbas, éstas le roban el alimento, el agua, la luz y el aire al cultivo.

Las malas hierbas tienen, en general, un crecimiento rápido y vigoroso, absorben una gran parte de abonos aportados al suelo y, en particular, los nitratos. También absorben una cantidad importante de agua del suelo, siendo ésta un factor

importante en la producción del vegetal cultivado ya que transporta en su interior todas las materias minerales absorbidas por las raíces. La reducción de esta circulación retrasa el transporte de materias nutritivas, comprobándose una reducción de la asimilación clorofílica y de la producción de materias de síntesis y, por consiguiente, un retraso en el desarrollo de la planta cultivada.

La luz juega un papel indispensable en la vida de las plantas. Bajo su influencia la clorofila absorbe el ácido carbónico del aire y sintetiza las materias orgánicas indispensables para el desarrollo vegetal, uniendo el carbono del ácido carbónico a la savia mineral. Una disminución de ella significa una reducción del rendimiento y se traduce también en una disminución de la producción y en que el cultivo, en busca de la luz, alarga desproporcionalmente el tallo, el cual se queda delgado, pierde su color verde y se vuelve clorótico.

Por otra parte, se pueden producir fenómenos de antagonismo o alelopatía, es decir, las semillas en germinación y los restos de ciertas plantas (raíces o partes aéreas enterradas) pueden ejercer un antagonismo respecto a otras especies (plantas cultivadas o malas hierbas). Así, los trabajos de Guyot en Francia, demuestran claramente que las aguas de lavado de ciertas plantas, inhiben la germinación y desarrollo de otras especies. Estos fenómenos de antagonismo tienen su explicación en el hecho de que ciertos vegetales contienen en sus tejidos sustancias fitotóxicas que liberan, por descomposición en el suelo o en su superficie, o las segregan a través de sus raicillas, produciendo una mayor o menor molestia a las plantas situadas en sus inmediaciones. El lino y el rábano se muestran más sensibles a estos efectos fototóxicos que los cereales.

Otro aspecto perjudicial de la presencia de malas hierbas estriba en que, al

ser tóxicas, pueden envenenar al ganado o causarle una seria reducción de su peso, produciendo intoxicaciones, a veces mortales, cuando se consumen en cantidad suficiente por el animal (Colchicum, Ranunculus acris, Senecio Jacobea). También pueden infectar céspedes y jardines o producir semillas tóxicas que pueden conferir a las harinas, cuando se presentan en gran cantidad, propiedades peligrosas para la salud humana o para los animales domésticos (Agrostemma Ghitago). De hecho, en los pastos, los animales rechazan determinadas especies de malas hierbas con la consiguiente pérdida de la superficie útil, como es el caso de los gnomones de las dehesas.

Las malezas o malas hierbas pueden hospedar insectos y organismos enfermos que atacan las plantas del cultivo. Por ejemplo, el gorgojo y el tizón de la zanahoria pueden hospedarse en zanahorias silvestres, para luego atacar sólo a las zanahorias cultivadas. Los áfidos y las larvas de moscas de las raíces del repollo pueden vivir en la mostaza y luego atacar el repollo, la coliflor, el rábano y los nabos. El gusano de la cebolla vive en la ambrosía y en la mostaza y luego puede parasitar los cultivos de cebolla. En invierno, hay muchos insectos en los campos con malezas y en los cercados. Organismos dañinos como el hongo de tallo negro pueden utilizar el berberis europeo, algunos pastos o la avena silvestre como huéspedes, antes de atacar el trigo, avena o cebada [1].

En cuanto a las semillas de malas hierbas, éstas producen una contaminación en la cosecha de granos y tubérculos, disminuyendo e incluso anulando su valor para siembra posterior o venta directa, puesto que bajan la calidad de cualquier tipo de cosecha. Por otra parte, son huéspedes temporales de plagas y enfermedades que se transmiten luego a los cultivos y por último dificultan las labores habituales de los cultivos.

Las malas hierbas también reducen la eficiencia humana al producir envenenamientos y alergias tales como la fiebre del heno, causada principalmente por el polen de las malezas durante el otoño y el verano.

Las pérdidas en agricultura y el incremento en el costo de la producción alimentaria, debido a las malas hierbas, son mayores de lo que se pudiera creer, al estar esparcidas y ser tan comunes, en general no sabe cuánto se pierde a causa de ellas y cuánto se gasta en controlarlas.

I.A.4.- CAUSAS DEL DESARROLLO DE LOS HERBICIDAS

Como consecuencia del impresionante aumento demográfico que ha sufrido la Tierra y, por tanto, de la demanda de alimentos se ha planteado la escarda de los cultivos, para aumentar la producción.

El desarrollo de hierbas indeseables junto a los cultivos origina diversos problemas, disminuye la producción, dificulta el laboreo y recolección y hace necesaria la mano de obra o el uso de plaguicidas para su eliminación. Por ello, las hierbas indeseables limitan la producción agrícola, reducen la calidad de las cosechas, y repercuten considerablemente sobre la economía. Todo ello ha hecho que el uso de los herbicidas se haya impuesto como una de las operaciones más necesarias para conseguir cosechas estables de alto rendimiento, así como para mantener despejados los linderos de las vías férreas, las zonas bajo tendidos eléctricos y para mantenimiento de cortafuegos libres de vegetación.

La base de la lucha herbicida es el conocimiento profundo de las hierbas a erradicar, y seleccionar las materias activas idóneas para obtener un control

económico sin degradar el medio ambiente. Durante cientos de años, el hombre luchó contra las malezas contando sólo con sus manos, o empleó estacas puntiagudas, azadas, fuerza animal y finalmente fuerza mecánica.

La evolución de la lucha química contra plantas adventicias se inició a finales de siglo, al introducirse el ácido sulfúrico en cultivo de cereales, disputándose la primacía en la introducción de los tratamientos con productos químicos para eliminar las hierbas perjudiciales Inglaterra y Estados Unidos. Fue en este último país donde esta técnica llegó a ser rápidamente una práctica usual, y desde allí se ha ido extendiendo, primero a los países agrícolas de técnica avanzada, y luego por todo el mundo. Desde entonces, el progreso ha sido constante. Se han empleado herbicidas inorgánicos, derivados del petróleo, compuestos nitrados (1932), productos hormonales (desde 1945) .

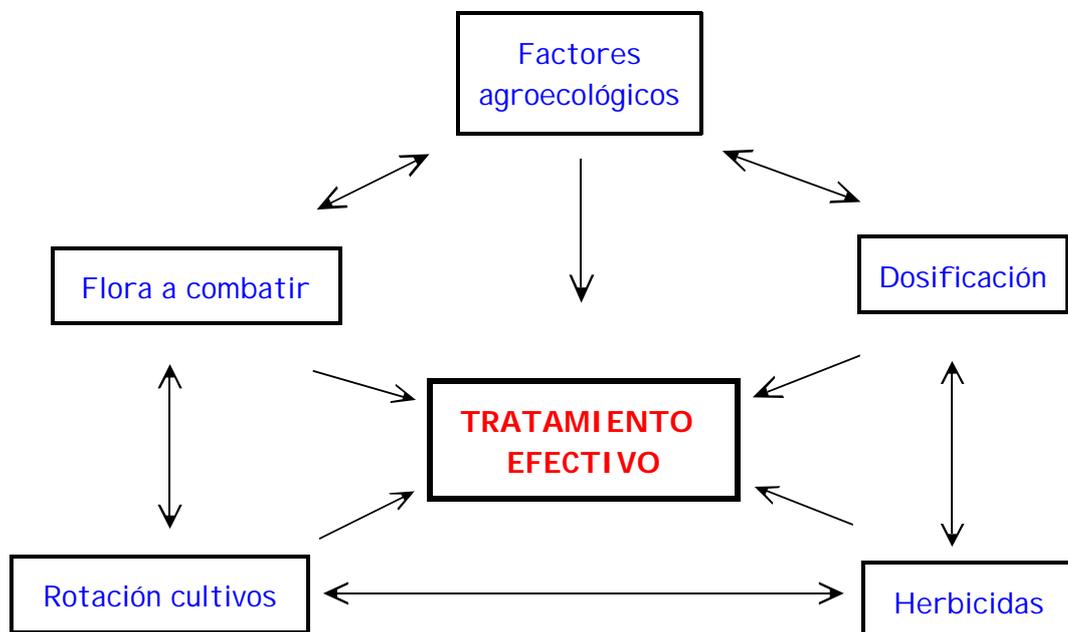
Hacia 1940, sólo se usaban algunos herbicidas inorgánicos de contacto, aceites y esterilizantes del suelo para limpiar terrenos de hierbas de un modo general. Los productos más frecuentes eran el clorato sódico, el arseniato sódico y el bórax. El sulfato de hierro y las sales de cobre se utilizaban para destruir la maleza de algunos céspedes sin perjudicar a la hierba. En los últimos 40 años, el desarrollo continuo de esta rama pesticida ha sido considerable, dando entrada al uso común de una extensa serie de productos de origen orgánico.

El hecho más decisivo, en el desarrollo práctico de los herbicidas, ha sido el descubrimiento de las propiedades bioquímicamente selectivas del ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Por otra parte, en el desarrollo de los nuevos herbicidas "hechos a medida" se ha conseguido mucha mayor precisión en su uso, lo cual requiere, a su vez, una mejor información sobre las técnicas de aplicación. En conjunto, el

tratamiento con herbicidas ha alcanzado actualmente tal extensión, que ha dado lugar a una rama de la industria química de una importancia excepcional.

Los herbicidas utilizados actualmente deben su aceptación a su selectividad, que les permite destruir malas hierbas sin afectar a los cultivos, y a su gran eficacia, que permite utilizar dosis muy pequeñas, con las que la aplicación resulta más económica. Un herbicida selectivo es un arma de doble filo, en el que la dosificación es esencial para su buen funcionamiento, ya que no llegar a la dosis supone no eliminar la flora indeseable y sobredosificar conlleva acabar con el cultivo.

A continuación, se muestra un esquema en el que se indica los factores a considerar a la hora de conseguir un tratamiento herbicida efectivo [2].



La clave del éxito de un tratamiento herbicida está en adecuar las materias activas idóneas para combatir la flora invasora, dosificando perfectamente el

producto de acuerdo con el terreno o desarrollo del cultivo y malas hierbas, sin perder de vista la rotación de aquellos. La exacta identificación "a priori" de la flora que va a invadir la parcela de un cultivo es la base fundamental de la elección juiciosa de un herbicida.

El estudio de los herbicidas requiere la definición previa de varios términos relativos a su clasificación, que puede hacerse en base a distintos aspectos.

g Atendiendo a la acción que ejercen sobre las plantas pueden ser **totales**, si destruyen toda la vegetación presente, sin discriminación, incluyéndose aquí los esterilizantes de suelos, o **selectivos** si sólo destruyen malas hierbas de los cultivos, pero dejan indemnes a éstos.

No obstante, los términos "total" y "selectivo" son bastantes relativos, ya que dependen de dosis empleadas y especies vegetales; un herbicida puede ser "selectivo" a dosis bajas y comportarse como "total" a dosis altas. El efecto herbicida depende también de la edad y vigor de las plantas: un árbol escapa más fácilmente a su acción que un cultivo hortícola que es, generalmente, mucho más sensible. En términos corrientes, la denominación "total" conviene a productos de acción completa o casi completa, en tanto que "selectivo" es calificación más propia de herbicidas que respetan al cultivo de aplicación, a causa de una selectividad cuyo origen, con frecuencia, no está bien aclarado.

g En base a su forma de aplicación, hay herbicidas de **presiembr**a que se aplican antes de sembrar o plantar. De **preemergencia**, si se emplean después o al mismo tiempo de la siembra, pero antes de que el cultivo emerja del suelo y de **post-emergencia**, si se usan sobre el cultivo ya emergido y más o menos desarrollado.

De nuevo, tales definiciones también son relativas; un mismo herbicida puede ser de presembrado y preemergente, o preemergente y post-emergente, o ambos casos a la vez, según sus condiciones de aplicación, dosis, cultivo, etc... Debe distinguirse entre pre y post-emergencia del cultivo y de las malas hierbas ya que es común usar estos términos aplicados a herbicidas selectivos pero sin especificar a qué se refieren, si a las hierbas o al cultivo. En este Trabajo nos atenderemos a la definición de que: preemergente significa que se usa antes de emerger el cultivo, y post-emergente, después de emergido o con cultivo presente.

g Según la forma de actuar sobre la planta pueden ser **de contacto**, también llamados de traslocación y **residuales** o de superficies. Los primeros destruyen la planta por contacto y los segundos, se aplican al suelo, antes de nacer las hierbas o cuando éstas están germinando y, al ser absorbidos por las raíces de la plántula o la semilla, destruyen la hierba. Sin embargo, no puede precisarse una delimitación clara en estas dos maneras de actuar pues hay muchos herbicidas residuales que también actúan por contacto, generalmente sobre hierbas poco crecidas.

g Son varios los sistemas de aplicación de un herbicida y en base a éstos un herbicida puede ser **total** si tanto el cultivo como las malas hierbas reciben el herbicida, el cual se aplica sobre todo el campo, sea pre o post-emergente; **dirigido** o en bandas si se aplica sólo a la línea de cultivo, o entre calles ahorrando así líquido y producto y **fraccionado** o "splitting" si la dosis total de aplicación se fracciona en dos tratamientos distanciados unos días.

Dado que una gran parte de los herbicidas empleados son de carácter selectivo, para su mejor eficacia, en su aplicación deben tenerse en cuenta varios factores.

En cuanto al transporte por la savia, es diferente que el herbicida se absorba por raíces y de allí pase a hojas, o que de éstas se trasloque a las raíces u otros puntos. En el primer caso, absorción radicular, es importante que llegue a las raíces y se ponga en contacto con ellas; en el segundo, absorción foliar, lo fundamental es mojar bien la planta.

Por otra parte, no basta con que el herbicida actúe, se requiere una cierta persistencia para que su efecto dure algún tiempo, evitando el crecimiento y rebrote de las malas hierbas, sobre todo para los de acción residual. No obstante, su persistencia no debe ser excesiva porque podría interferir en cultivos posteriores e incluso esterilizar el suelo. Aunque sea deseable una acción rápida, no debe creerse que los herbicidas de acción inmediata son los más eficaces, pues en general son menos persistentes

Por último, es muy importante tener en cuenta la flora adventicia del cultivo que debe tratarse, ya que todo herbicida posee sus propias limitaciones, combatiendo con determinadas especies y dejando incólumes a otras. Un herbicida puede ser adecuado en ciertos sitios e inadecuado en otros, radicando la diferencia en la flora adventicia dominante que varía según zonas y regiones y que conviene conocer.

Actualmente, el desarrollo de los herbicidas se encamina a una "selectividad específica" para que sean lo más seguros posible para el cultivo y obtener, a la vez, un amplio espectro de acción. La ampliación de la gama de efectividad se consigue muchas veces uniendo un par de herbicidas, abundando mucho tales mezclas. También es frecuente mezclar uno de contacto con otro residual, a fin de que el primero destruya las hierbas presentes y el segundo prevenga reinvasiones y rebrotes. Las combinaciones que se pueden formar en uno y otro caso son innumerables y no tienen

otra limitación que la selectividad frente al cultivo.

La utilización constante de un mismo herbicida sobre un cultivo determinado puede conducir, a la larga, a un cambio de la flora adventicia. Al actuar el herbicida sobre las malas hierbas sensibles a él, y no sobre otras, hace que éstas últimas vayan invadiendo el terreno más o menos lentamente, de modo que al cabo de un tiempo, las hierbas dominantes han dejado de tener importancia para ceder su sitio a otras en las que el herbicida usual es menos efectivo. Para resolver el problema debe cambiarse de herbicida o bien recurrir a mezclas con otros que sean efectivos sobre la nueva flora dominante.

La aplicación de los herbicidas presenta un problema general que es la precisión de limpiar escrupulosamente la maquinaria empleada en estos tratamientos, para evitar que los residuos dañen a los cultivos cuando la misma se use en otras aplicaciones. En la mayoría de los casos, basta un par de lavados con agua y detergente seguido de un enjuague abundante tanto de la maquinaria como de sus accesorios, pero es necesario efectuarlo inmediatamente después de su uso. Con otros herbicidas, como es el caso de los hormonales, se requiere un lavado más enérgico, empleando soluciones de sosa que destruyen el herbicida y efectuando luego un lavado.

Otra precaución importante a tener en cuenta, es evitar toda contaminación de otros productos con ellos. Además, en tanto se hace el tratamiento, debe evitarse que el producto sea arrastrado por el aire a cultivos cercanos (efecto de deriva), en los que podría causar daño.

La gran cantidad de herbicidas que se aplica actualmente en la agricultura contribuye a la presencia de sustancias tóxicas en aguas superficiales o subterráneas, y posteriormente, en las de consumo humano.

El agua está considerada como el bien máspreciado de nuestros recursos naturales. En las zonas rurales, el agua de los pozos es a menudo la única fuente de obtención de agua con la calidad aceptable para el ser humano, sin tratamiento previo. Sin embargo, este agua puede ser contaminada por los desechos domésticos, industriales y agrícolas, entre estos últimos se incluyen los fertilizantes y herbicidas [3-5]. Podemos considerar cuatro causas por las que el agua se puede contaminar de pesticidas [6]:

- Tratamiento de pesticidas, como consecuencia de las prácticas agrícolas, que pueden generar una contaminación de las aguas superiores a los 10 : g L^{-1} .
- Aguas de enjuague contaminadas con pesticidas procedentes de contenedores y equipos de espolvoreo: $0.01-0.10 \text{ : g L}^{-1}$.
- Aguas de desecho procedentes de la industria agrícola: $0.01-0.10 \text{ : g L}^{-1}$.
- Aguas de desecho procedentes de las plantas dedicadas a la formulación y manufactura: $0.001-1.0 \text{ : g L}^{-1}$.

Los herbicidas pueden afectar el fitoplancton y zooplancton de las comunidades de peces que habitan en los viveros a través de rociado o espolvoreo del herbicida en los cultivos próximos a las piscifactorías. En principio, las cantidades de herbicidas presentes en las aguas no superan los niveles tóxicos para los peces. Sin embargo, una muerte o reducción de la velocidad metabólica del fitoplancton reduciría el suministro de oxígeno y la eliminación de los desechos nitrogenados tóxicos, así como la producción del plancton. De ese modo, los productores de

zooplancton podrían verse afectados por la toxicidad de los herbicidas, terminando por reducir su crecimiento o morir. Estas condiciones derivarían en enfermedad, bajo crecimiento o muerte de los peces de las piscifactorías. Tucker realizó una investigación en ese sentido y encontró que si usaba Propanil [7] , en el rango de concentraciones comprendido entre 0.033 y 0.170 mg L⁻¹, disminuía la velocidad de fotosíntesis del fitoplancton del vivero en un 25 - 75 %, medido 3 horas después de su aplicación.

A continuación, se describen los herbicidas objeto de estudio en la presente Memoria, fitohormonas, y combinaciones nitrogenadas, analizando brevemente sus características más comunes [8,9] y los métodos empleados para su análisis.

I.A.5.- CARACTERÍSTICAS. MÉTODOS DE ANÁLISIS

I.A.5.1.- Fitohormonas

Las fitohormonas son hormonas reguladoras del crecimiento, cuyo uso actual en las explotaciones agrícolas, es corriente. Según Thimann [10] *“Una fitohormona es una sustancia producida de forma natural en las plantas superiores y controla el crecimiento u otras funciones fisiológicas. Se desplaza de la región donde se ha formado a otras partes para asegurar la regulación del alargamiento celular. Es activa en proporciones mínimas”*.

Estos productos, en general, presentan baja toxicidad, lo que hace que los niveles de residuos tolerados por las legislaciones, sean relativamente altos. No obstante, el hecho de que no sean altamente tóxicos no implica que no sean nocivos

si se ingieren de forma incontrolada, por lo que el análisis de dichos compuestos y la determinación de sus residuos en productos agrícolas de consumo humano, así como en aguas, son temas de gran interés.

Dentro de las fitohormonas estudiadas en la presente Memoria se encuentran dos derivados del ácido acético: ácido 1-naftilacético (NAA) y naftalenacetamida (NAD o NAAM) y los fenoxiácidos: ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T), ácido 2-metil-4-cloro-fenoxiacético (MCPA) y ácido 2-metil-4-cloro-fenoxi-2-propiónico (MCP).

Ácido 1-naftilacético y naftalenacetamida son dos de las fitohormonas empleadas desde hace más de 50 años, usadas en el aclareo de frutales. El objeto del aclareo es la eliminación del sobrante de flores o frutos que al competir por la nutrición, producirían frutos pequeños y no comerciales. Esta labor se efectuaba a mano por el agricultor, con el consiguiente elevado coste de la mano de obra, de ahí el interés que desde hace tiempo presenta el aclareo químico.

Ambas fitohormonas se emplean fundamentalmente para el tratamiento de diferentes variedades de manzanos y perales, y con menos frecuencia para uvas. Presentan dos acciones: aplicadas justo después de la floración, inducen el aclarado de la fruta, o bien si la aplicación se realiza tres o cuatro semanas antes de la recolección, previenen la caída de ésta [9,11,12]. NAAM es usada con menor frecuencia que NAA, pese a ser la menos dañina para las hojas de los árboles tratados.

También pertenecen a este grupo los fenoxiácidos a los que se les denominan fitohormonas de síntesis, o simplemente fitohormonas.

El descubrimiento de las posibilidades herbicidas de estos derivados se debe a EEUU y a Gran Bretaña. En Estados Unidos, fueron Zimmerman y Hitchcock los que, en el año 1942, señalaron las propiedades reguladoras de crecimiento de 2,4-D. Su empleo como herbicida selectivo fue propuesto por Mitchell y Hammer, en 1944. En Gran Bretaña, Slade, Templeman y Sexton llegaron a la misma conclusión con MCPA, en 1942. Por razones de seguridad este descubrimiento no se publicó hasta el año 1945 [10].

La aparición de estos productos marca una verdadera revolución en las técnicas de la escarda química. Antes se acostumbraba a juzgar la calidad de un herbicida por su poder de necrosar tejidos vivos, es decir, lo que era la acción de los colorantes, ácido sulfúrico, cloratos, etc...

En el caso de las fitohormonas, su acción consiste en ejercer sobre la planta reacciones biológicas y provocar trastornos fisiológicos y morfológicos en el punto de aplicación y, en otras partes, trastornos que pueden causar la muerte. Las dosis empleadas son bajas, entre 0.5 y 2.0 %, siendo la normal del 1.0 % y los efectos aparecen con bastante lentitud.

Su penetración en los vegetales se efectúa por hojas y tallos, y son conducidos por todo el vegetal mediante la savia. Son herbicidas de traslocación y se absorben por los tejidos vegetales. Se transportan con la savia por medio del floema a todos los órganos de la planta, y por tanto ejercen su efecto sobre todo el vegetal. Son absorbidos por las raíces en dosis muy bajas y cuando esto ocurre las plantas se inmovilizan o mueren lentamente.

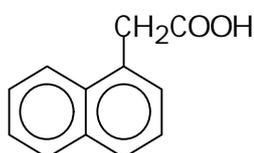
La fitoacción herbicida parece ser similar a la de las auxinas, si bien la

estructura del derivado juega un gran papel, especialmente a la hora de su selectividad. Los efectos de estos productos en las plantas sensibles dan como síntomas: producción anormal de raíces y yemas, destrucción de vasos, quemaduras, deformaciones, fin del desarrollo o crecimiento desordenado, amarilleo y, finalmente, su muerte. Fisiológicamente aumentan la respiración, disminuye la fotosíntesis y las reservas de sustancias nutritivas se agotan.

La degradación de estos productos, según algunos autores, es por hidroxilación del núcleo aromático y por la acción de microorganismos en el suelo.

g ÁCIDO 1-NAFTILACÉTICO (NAA)

Ácido 1-naftilacético, también conocido como NAA (Naftil Acetic Acid), es un polvo incoloro cristalino, cuyo punto de fusión es 134-135° C, de estructura:



Su solubilidad a 20°C es 420 mg kg⁻¹ en agua; 10.6 g L⁻¹ en tetracloruro de carbono (26°C) y muy soluble en acetona, etanol y propanol.

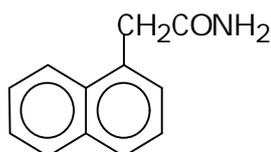
Entre las formulaciones comercializadas se encuentran: "Fruitone-N": concentrado soluble (35 g de acetato 2-(1-naftil) de sodio/L); "NAA-800": polvo soluble en agua (SP) (201 g de ácido 2-(1-naftil)acético/Kg); "Keriroot": mezcla de ácido 2-(1-naftil)acético y captan y "Rootone-F": mezcla de acetato 2-(1-naftil) de metilo, ácido 4-indol-3-ilbutírico, 2-(1-naftil)acetamida y tiran.

En relación con el aspecto toxicológico, el principal objetivo en el análisis de este tipo de sustancias es el control de cultivos agrícolas que van a ser consumidos por el hombre, así como de las aguas cercanas a estos cultivos. Dada su baja toxicidad, los niveles de tolerancia de estos compuestos son relativamente altos en las legislaciones de varios países. A pesar de que no son sustancias muy tóxicas, pueden ser peligrosas si se consumen en grandes cantidades. Presenta una dosis letal media, LD_{50} , por ingestión oral, en ratas, de 1000-5900 $mg\ kg^{-1}$ y en conejos, mayor de 5000 $mg\ kg^{-1}$, dérmica.

Con objeto de promover una maduración temprana de la fruta, varios productos químicos que son hormonas reguladoras del crecimiento de las plantas han sido utilizados en diferentes tipos de cultivos. Entre estas sustancias, NAA se ha demostrado útil para la prevención de la caída prematura de la fruta, así como para promover el crecimiento de las raíces, especialmente en manzanas, uvas, fresas y tomates.

9NAFTALENACETAMIDA (NAAM)

Naftalenacetanida es un sólido cristalino incoloro con punto de fusión $184^{\circ}C$. Escasamente soluble en agua, soluble en acetona, etanol y propanol e insoluble en queroseno. Es estable en condiciones normales de almacenamiento y no es inflamable y está comercializado como "Amid-Thin" ($84\ g\ kg^{-1}$). Obedece a la estructura:

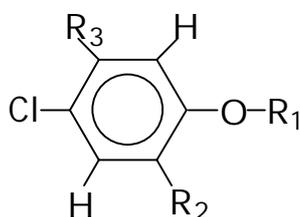


En cuanto a toxicidad, su LD_{50} aguda oral, para ratas, es de 6400 $mg\ kg^{-1}$ y la

aguda dérmica es mayor de 5000 mg kg^{-1} , para conejos. Es utilizado como un adelgazante de muchas variedades de manzanas y peras a 2.5-5.0 g/100 L, después de unos pocos días de la caída de los pétalos.

DERIVADOS DE ÁCIDOS

Otro de los grupos a estudiar son los fenoxiácidos, de estructura general:



Ya en 1942, como hemos señalado, se observaron las propiedades reguladoras del crecimiento de 2,4-D, aunque su empleo como herbicida no se propuso hasta 1944. Por su parte, MCPA también fue propuesto como herbicida en el mismo año. Fueron comercializados bajo el nombre de los "asesinos" de las malas hierbas en el césped, aunque también se empleaban en cultivos de cereales, en pastos y praderas.

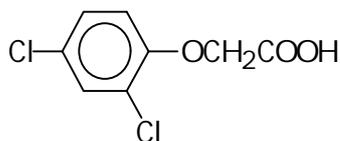
Dentro de este grupo de herbicidas, hemos elegido a 2,4-D; 2,4,5-T; MCPA y MCPP para ser estudiados en la presente Memoria.

Estos herbicidas son medianamente solubles en agua y pueden pasar fácilmente del suelo a los cereales y entrar a formar parte de la cadena alimenticia. Dependiendo además de la pluviosidad de las zonas así como de las propiedades del suelo, los herbicidas pueden ir a parar a las aguas subterráneas donde, debido a la ausencia de actividad microbiana, los procesos de degradación son muy lentos y el fenómeno de acumulación puede fácilmente conducirlos a niveles tóxicos.

Cuando éstos no son absorbidos por el suelo y quedan en la superficie, muchos persisten en el medio ambiente manteniéndose sin degradar, y se pueden acumular e incorporar a la cadena alimenticia, afectando al ser humano, aunque también pueden ser degradados por la acción del sol. Sin embargo, puede resultar peligroso contar únicamente con las condiciones climatológicas para su degradación, de ahí que algunos autores propongan procesos de degradación oxidativa para su eliminación. A continuación, se resumen sus características.

ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO (2,4-D)

2,4-D es un sólido blanco o tostado claro que se presenta en estado de escamas o cristalino, con punto de fusión 140.5 °C.



Es poco soluble en agua, 620 : g mL⁻¹ a 20°C, por lo que el ácido no se utiliza como tal, sino en forma de sales alcalinas, sales aminas y ésteres. Es soluble en alcoholes y soluciones alcalinas. Sus sales alcalinas y aminas son solubles en agua, a excepción de las de Ca (II) y Mg (II) que no lo son al igual que los ésteres.

Actúa fundamentalmente por absorción foliar y ligeramente por el sistema radicular, influyendo en la respiración de la planta y en la división de las células.

Los más activos son los ésteres, de tensión superficial baja, ya que dado su gran poder de penetración, se absorben por las hojas con mayor rapidez que las sales sódicas o de aminas y resisten mejor la lluvia.

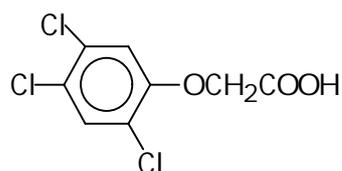
Se degrada por la acción microbiana de *Achromobacter* spp., *Aspergillus* spp., *Corynebacterium* spp., *Mycoplasma* spp. y *Nocardia*. Esta degradación microbiana está favorecida por el calor y la humedad, siendo pequeñas las pérdidas por fotodescomposición.

Es selectivo para avena, cebada, maíz, praderas de gramíneas y trigo, mientras que son sensibles a este herbicida las crucíferas (coliflor, col, etc.), leguminosas (habas, guisantes, berza, alfalfa, etc.), frutales de hueso y pepita, cítricos, olivo, girasol, lechuga, remolacha, tomate, viña, pepino, tabaco, algodón, flores. Por ello, la pulverización con ésteres ligeros en post-emergencia debe llevarse a cabo a distancia de los cultivos que sean sensibles al herbicida, a más de 1 km si la pulverización es aérea y de 100 m si es terrestre.

La DL_{50} oral, en ratas, es de 375 mg kg^{-1} y la dérmica de 1500 mg kg^{-1} . En humanos es peligroso en contacto con la piel y por ingestión. Así, el límite máximo de residuos, MLR, es de 0.1 : g mL^{-1} para productos vegetales, y 0.2 para forraje de gramíneas y paja de cereales.

ÁCIDO 2,4,5-TRICLOROFENOXIACÉTICO (2,4,5-T)

2,4,5-T es un polvo cristalino blanco de punto de fusión 153-157 °C, poco soluble en agua, 278 : g mL^{-1} a 25°C, muy soluble en etanol, metano, dietiléter y tolueno. En medio acuoso es estable entre pH 5 y 9.



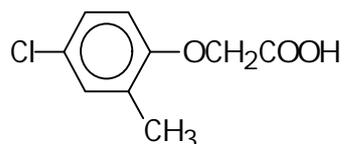
Es de absorción radicular y foliar, como el 2,4-D, con traslocación por el floema aunque su mecanismo básico de acción no es aún bien conocido y su degradación, microbiana, es más lenta que en caso del 2,4-D.

Es selectivo y autorizado para terrenos sin cultivo, bosques, caminos y cortafuegos, siendo sensibles a su acción los mismos cultivos que lo son al 2,4-D y su forma de aplicación similar a las de aquel.

Es menos tóxico, presentando una DL_{50} oral, en rata, de 500 mg kg^{-1} y dérmica superior a 5000 mg kg^{-1} . El MLR, en frutas frescas o desecadas, frutos de cáscara, hortalizas frescas, legumbres, semillas oleaginosas, patatas, té y lúpulo desecado es de $0.05 : \text{g mL}^{-1}$.

ACIDO 2-METIL-4-CLORO-FENOXIACÉTICO (MCPA)

MCPA es un sólido, en escamas o en cristales, blanco amarillento de $119.7 \text{ }^\circ\text{C}$ de punto de fusión.



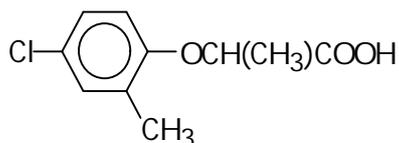
Es más soluble en agua, $1500 : \text{g mL}^{-1}$, y disolventes orgánicos que los dos anteriores, y su absorción y acción es similar a la descrita.

La degradación es microbiana y rápida, permaneciendo los residuos en suelos largo tiempo, especialmente en los muy secos. Tiene una persistencia de un mes en condiciones de humedad y hasta seis meses en terrenos muy secos.

Está autorizado y es selectivo para arroz, avena, caña de azúcar cebada, lino y trigo, siendo su época de aplicación específica de cada cultivo. Los cultivos sensibles a MCPA son los mismos que los señalados para los herbicidas anteriores, al igual que la forma de aplicación. Los MLR son similares a los del 2,4-D.

ÁCIDO 2-METIL-4-CLOROFENOXI-2-PROPIÓNICO (MCPP)

Determinados derivados del ácido fenoxipropiónico, los " " sustituidos, como 2-metil-4-clorofenoxi-2-propiónico, también llamado Mecoprop, poseen propiedades herbicidas análogas a las de los derivados fenoxiacéticos. Por el contrario, los derivados \$ sustituidos son inactivos.



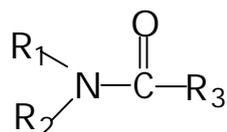
MCPP es un sólido pardo o incoloro que se presenta en forma de escamas o cristales, con 92-95°C de punto de fusión. Es menos soluble en agua, 620 : g mL⁻¹, y en disolventes orgánicos que MCPA.

Es menos tóxico que MCPA. Presenta, en ratas, una DL₅₀ oral de 930 mg kg⁻¹ y dérmica de 900 mg kg⁻¹, siendo estable a la temperatura, hidrólisis, oxidación y reducción.

Es selectivo y está autorizado para cultivos de avena de primavera, cebada y trigo de invierno y primavera. Los límites máximos de residuos son de 0.1 : g mL⁻¹ para vegetales, salvo cereales que es de 0.2 : g mL⁻¹.

I.A.5.2. - Combinaciones nitrogenadas

Un grupo numeroso de herbicidas es el formado por las combinaciones nitrogenadas, de fórmula general:



La penetración de estos herbicidas se produce fundamentalmente por vía radicular, si bien algunos son absorbidos por las hojas y, a continuación, son traslocados. Por tanto, son de acción residual preponderante.

Su fitoacción herbicida parece ser que se centra en la inhibición de la germinación y del crecimiento radicular. En cuanto a la metabolización, en muchos casos, no se conoce bien, aunque en algunos se ha comprobado que sufren descomposición microbiana, no siendo muy elevada su persistencia.

Dentro de las combinaciones nitrogenadas, distinguimos, con la denominación de herbicidas ureicos, a los herbicidas que pueden considerarse derivados de la urea:



por sustitución total o parcial de los hidrógenos de los grupos $-\text{NH}_2$ por radicales orgánicos.

Su penetración en los vegetales se efectúa principalmente a través de las raíces, como herbicidas residuales, pero algunos también poseen acción de contacto con traslocación, de modo que pueden usarse sobre hierba ya emergida, en estado joven y con crecimiento activo.

Su fitoacción herbicida, fundamentalmente consiste en la inhibición de la reacción de Hill, impidiendo la formación de hidratos de carbono, con producción de clorosis o necrosis de tejidos, por lo que la planta detiene su crecimiento, se seca y muere. Son, por tanto, inhibidores de la fotosíntesis, siendo los síntomas de clorosis los indicadores de fitotoxicidad. Cuando son absorbidos por el sistema radicular impiden la división celular de las raíces y la formación de nitratos. Si penetran por vía folicular, provocan necrosis localizadas, que más tarde se extienden a toda la planta. Dado que está comprobada la absorción en el vegetal a través de las raíces, es necesario que el terreno esté húmedo o incluso regado para que el herbicida actúe.

Un aspecto importante de estos herbicidas es su adsorción por el suelo. Todos los derivados ureicos poseen cierta solubilidad en agua. Para que actúen como tales, han de estar disueltos en agua que será el vehículo en el que serán absorbidos por las raíces. Este condicionamiento entre adsorción y solubilidad tiene gran importancia en la práctica. Al ser adsorbido por la superficie del suelo, el herbicida no actúa sobre la semilla, enterrada más profundamente, pero sí contra las malas hierbas de semilla que están en la superficie, constituyendo esta propiedad la llamada **selectividad mecánica o física**. Esto debe tenerse en cuenta en cultivos algo sensibles a herbicidas, para los que se recomienda sembrar profundo para eludir el efecto fitotóxico sobre la semilla que germina.

Dada la escasa solubilidad de estos derivados, conviene, como norma general, que el suelo esté en sazón cuando se aplican, usando grandes volúmenes de agua. El riego posterior es, con frecuencia, necesario y conviene para asegurar la efectividad. Si estas condiciones de humedad no se cumplen y después no hay lluvias o riegos, el herbicida quedará fuertemente adsorbido en la superficie y el efecto final será

mediocre. Por esta razón, se observa que en suelos que mantienen una humedad discreta (cerca de ríos, arroyos o sometidos a nieblas y rocíos constantes), los efectos herbicidas y su persistencia son muy buenos, pues la humedad continua, aunque escasa, disuelve cantidades continuadas de herbicida y el control de malas hierbas es muy prolongado. En suma, los fenómenos de adsorción y desorción son factores preponderantes de la eficacia.

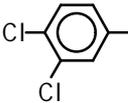
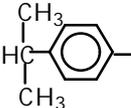
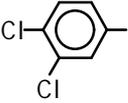
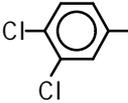
La adsorción de estos herbicidas es fuerte en suelos ricos en materia orgánica y arcillosos, y menos acusada en los arenosos, ligeros o sueltos. Por eso, y como norma general, las dosis a emplear son más altas en suelos arcillosos u orgánicos que en los sueltos o arenosos, aplicándose esta norma no sólo a los ureicos sino también a otros herbicidas en que concurren iguales fenómenos de adsorción.

Con relación a la degradación en el suelo, hay que señalar que la adsorción comentada y la escasa solubilidad, hace que el lavado por lluvias o riegos sea poco significativo en la desaparición de estos herbicidas del suelo. El papel preponderante en su degradación corresponde a los microorganismos, hecho que se ha demostrado al comparar su permanencia en suelos estériles y no estériles. Varios de estos microorganismos han sido identificados y comprenden no sólo bacterias, sino también hongos, capaces de utilizar estos herbicidas como fuente de carbono, sea aisladamente, sea en presencia de otros soportes. La degradación conduce, en último término, a derivados aminados. El ataque primario proporciona una monometilurea, menos fitotóxica que su antecesor; este derivado es el que da el derivado de anilina o similar, no tóxico a las plantas, que sufre una posterior y lenta degradación y asegura en la mayoría de los casos, la ausencia de residuos en el suelo después de un tiempo prudencial, de modo que, normalmente, los tratamientos herbicidas no afectan a los cultivos posteriores.

En la presente Memoria se han estudiado cuatro de estos derivados, Diurón, I soproturón, Linurón y Neburón en los que R_1 es, en todos los casos, un hidrógeno, R_3 , un grupo metilo y R_2 y R_4 los señalados en la Tabla I.A.1.

A continuación, se resumen las características de cada uno de ellos.

Tabla I.A.1.- Radicales que forman parte de la estructura de las fenilureas en estudio.

Materias activas	R_2	R_4
Diurón		-CH ₃
I soproturón		-CH ₃
Linurón		-O-CH ₃
Neburón		-(CH ₂) ₃ -CH ₃

DIURÓN

Es un polvo blanco cristalino de punto de fusión 157-159 °C, con una solubilidad

en agua a 25°C de 42 g kg⁻¹, 0.1-2.0 g kg⁻¹ en toluol, 1.0-2.0 en diclorometano y propanol y 0.02 en n-hexano.

Es estable a la oxidación y a la humedad en condiciones normales, en medio neutro y a temperatura ambiente, pero se hidroliza a altas temperaturas, así como en medios ácidos y básicos.

Es poco absorbido por el sistema foliar de las plantas. Su acción preferente es residual, por lo que también se absorbe por las raíces. Las ramas con menos de 3 años poseen absorción cortical de este herbicida. La traslocación se efectúa a través del xilema, inhibiéndose la reacción de Hill, en las plantas, así como su facultad de asimilar CO₂ y de elaborar glúcidos.

Se adsorbe por coloides del suelo, tanto húmicos como arcillosos. La degradación microbiana juega un papel primordial en la eliminación de este herbicida en el medio y la fotodescomposición o volatilización es insignificante en condiciones normales, pero su exposición, en superficie, a condiciones de calor y sequedad, durante varias semanas sí puede degradarlo. Tiene una persistencia no superior a un año, excepto cuando se usan dosis elevadas.

Es selectivo y está autorizado para los cultivos de agrios, alcachofa, alfalfa, algodón, clavel, espárrago, frutales de pepita, olivo, terrenos sin cultivo y viñedo.

La dosis de este herbicida varía con los cultivos y con la textura del suelo. No se debe utilizar en tierras arenosas y es conveniente dar un riego después de la aplicación.

Presenta, en rata, una DL_{50} oral de 3400 mg kg^{-1} y dérmica superior a 5000 mg kg^{-1} , no siendo recomendable introducir el ganado, a pastar, en parcelas tratadas hasta que no transcurran al menos 15 días desde el tratamiento.

El límite máximo de residuo, en frutas y vegetales es de $0.02\text{-}1.0 \text{ mg kg}^{-1}$ y en cereales de $0.05\text{-}1.0 \text{ mg kg}^{-1}$.

Diurón es, de hecho, el producto más interesante, no sólo como herbicida total, sino como selectivo. Su persistencia es mayor, particularmente en suelos ligeros. En los últimos tiempos, ha sido empleado con fines no agrícolas en carreteras, autopistas, ferrocarriles y campos de golf, lo que aumenta la posibilidad de acumulación conduciendo a niveles tóxicos [13] si éste pasa a las aguas subterráneas donde la acción microbiana es casi nula y los procesos de degradación lentos.

I SOPROTURÓN

Es un sólido blancuzco cristalino con $155\text{-}156 \text{ }^\circ\text{C}$ de punto de fusión, una solubilidad en agua a 20°C de $72 : \text{g mL}^{-1}$ y fácilmente soluble en disolventes orgánicos comunes como alcoholes, cetonas, ésteres, hidrocarburos aromáticos e hidrocarburos clorados.

Es bastante estable a la luz, álcalis y ácidos pero se hidroliza con los álcalis fuertes en caliente, con una persistencia de dos a cuatro meses en función de las características del suelo.

Su absorción es radicular, por lo que se deberá emplear cuando no estén germinadas las malas hierbas. Inhibe la reacción de Hill, la facultad de asimilar CO_2

y la formación de glúcidos.

Es selectivo y está autorizado para los cultivos de cebada de invierno y trigo blando, siendo el mejor momento de aplicación la post-emergencia precoz de los cultivos (entre las 3 hojas y el final del ahijamiento del cereal). En suelos arenosos o calizos, se empleará la dosis más baja de 1.5 kg/ha de materia activa. Los cereales pueden soportar hasta 1.75 kg/ha de materia activa.

Su DL_{50} oral, en ratas, es de 2417 mg kg⁻¹ y dérmica superior a 3170 mg kg⁻¹ y los MLR son de 0.05 : g mL⁻¹, en frutas, cereales y vegetales y de 0.2 : g mL⁻¹, en paja de cereales.

LINURÓN

Linurón, también conocido como metoxidiuron, es un polvo cristalino blanco de punto de fusión 93-94 °C. Su solubilidad en agua a 25°C es de 75-81 : g mL⁻¹, siendo más soluble en acetona, benceno, dimetilformamida, cloroformo, dimetiléter y etanol. Es moderadamente soluble en hidrocarburos aromáticos y poco soluble en hidrocarburos alifáticos.

Es estable en medio neutro, pero se hidroliza lentamente en medios ácidos y básicos; y más rápidamente a altas temperaturas. Es estable a la oxidación y humedad en condiciones normales.

Su absorción es por vía radicular, por lo que se emplea en presembrado o preemergencia de los cultivos, cuando las malas hierbas no han germinado. Se trasloca a través del xilema e inhibe fuertemente la reacción de Hill.

A Linurón habría que considerarlo como un herbicida de absorción radical por excelencia. Sin embargo, posee una absorción foliar más enérgica que Diurón. La penetración por las hojas queda localizada y casi no se extiende más allá del punto de contacto. Por esta razón, sólo destruye las hierbas anuales muy jóvenes, siendo necesario mojar bien toda la parte aérea de las mismas.

Al igual que sucede con los demás herbicidas de absorción radical, las lluvias importantes, poco tiempo después de la aplicación, pueden disminuir su selectividad al arrastrar el producto a la zona de las raíces de la planta cultivada. Por otra parte, su acción herbicida puede quedar pobre durante periodos de sequía prolongados, sobre todo si el tratamiento se ha hecho sobre terreno reseco.

En cuanto a la adsorción del herbicida al suelo, ésta es tanto mayor cuanto más elevados sean los contenidos en arcillas o materia orgánica.

Los microorganismos del medio constituyen el principal factor de degradación de este herbicida y las pérdidas por fotodescomposición o volatilización son pequeñas, excepto cuando se expone en superficies, durante varias semanas, a la acción del sol en condiciones de sequedad. La persistencia es bastante corta de manera que dosis de 0.5 a 1.5 kg desaparecen a los tres o cuatro meses de la aplicación.

Está autorizado y es selectivo para los cultivos de agrios, ajo, alcachofa, apio, caña de azúcar, cebolla, espárragos, frutales de pepita, girasol, maíz, nabos, patata, perejil, puerro y zanahoria.

Las dosis de utilización hay que adecuarlas al cultivo, textura del suelo y su

materia orgánica. Por otra parte, no se debe sembrar ningún otro cultivo, más que los selectivos, hasta transcurrir al menos 4 meses.

En cuanto a su toxicidad, presenta valores de DL_{50} oral de 1500-4000 $mg\ kg^{-1}$, en ratas y 500 $mg\ kg^{-1}$, en perros. Para frutas y vegetales, el límite máximo de residuo es de 0.02 -1.0 $mg\ kg^{-1}$ y de 0.05 -1.0 $mg\ kg^{-1}$, para cereales.

NEBURÓN

Es un sólido cristalino blancuzco con 101.5-103 °C de punto de fusión, muy poco soluble en agua, 4.8 : $g\ mL^{-1}$ y escasamente soluble en hidrocarburos comunes.

Es muy estable a la humedad y a la oxidación atmosférica en medio neutro, en donde la hidrólisis puede aparecer a altas temperaturas. Se hidroliza con álcalis y ácidos.

Entre los cuatro derivados de la urea estudiados, parece ser, al menos teóricamente, el más adecuado para los tratamientos selectivos, dada su baja solubilidad y el poca absorción a través de las hojas. La capa de tierra tratada queda más delgada, lo que permite utilizarlo en cultivos como judías, guisantes, fresas, que no podrían soportar un tratamiento con otras fenilureas. Sin embargo, su empleo ha quedado limitado por varias razones: En primer lugar, al ser fuertemente adsorbido por las materias orgánicas de los suelos, su acción herbicida puede quedar pobre en suelos muy fuertes y húmicos. Por otra parte, la elevada dosis de empleo, de 2 a 4 kg de materia activa por ha, junto con su precio, más elevado que en otros derivados de urea.

Su toxicidad viene dada por una DL_{50} oral en ratas superior a 11000 $mg\ kg^{-1}$.

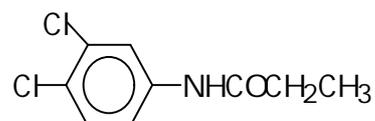
El último de los herbicidas estudiado en esta Memoria es Propanil, perteneciente al grupo de las amidas y que se aplica principalmente al control de malas hierbas en cultivos de arroz.

El cultivo del arroz es una práctica agrícola bastante importante en la zona norte de Extremadura. Actualmente, se emplean gran cantidad de agentes químicos para tratar las tierras en las que se cultivará el arroz, tales como insecticidas, fungicidas y especialmente, herbicidas. Muchas veces, los agricultores no realizan las aplicaciones de estos productos con las precauciones que debieran, y no son conscientes del peligro que supone un abuso de éstos. También hay que tener en cuenta que muchas veces no se toman las precauciones pertinentes a la hora de llevar a cabo su aplicación, por ejemplo, cuando no se utiliza la ropa adecuada cuando se espolvorea el producto, o cuando se espolvorea demasiado cerca de ríos, charcas y pantanos y, además, se lavan los instrumentos empleados para tal fin en los canales de desagüe o en los pantanos y charcas. Todos estos malos hábitos tienden a aumentar la contaminación de las aguas, lo que supone un peligro real y potencial para el ecosistema acuático, los animales y, en suma, los seres humanos. Se ha publicado [14] que las acequias se contaminan notablemente justo después del tratamiento de los campos con Propanil, con niveles de concentración superiores a 1 g L^{-1} .

Este herbicida tiene una larga actividad residual en suelos y aguas, permaneciendo en ellos durante meses, cuando la actividad microbiana es escasa. Sus presiones de vapor relativamente bajas y sus moderadas solubilidades en agua, hacen que este tema sea de interés prioritario.

g PROPANIL

Es un polvo cristalino incoloro a grisáceo de olor picante , con un punto de fusión 91.5-93 °C y de estructura:



Presenta una baja solubilidad en agua, 200 : g mL⁻¹, y de 1700 y 1100 g L⁻¹ en acetona y etanol, respectivamente.

En medios ácidos y alcalinos se hidroliza a 3,4-dicloroanilina y ácido propiónico. Tanto Propanil como 3,4-dicloroanilina son degradados rápidamente en agua por la luz solar, dando compuestos fenólicos que se polimerizan.

Se absorbe, fundamentalmente, por el sistema foliar de las plantas, ya que posee una marcada acción de contacto, traslocándose hacia partes de las plantas de mayor crecimiento. Causa clorosis seguido de desecación foliar y muerte en especies que no lo toleran.

En contacto con el suelo se degrada rápidamente, por acción de los microorganismos por lo que su persistencia es de sólo de alrededor de tres días.

Es selectivo y autorizado para los cultivos de arroz en post-emergencia de las malas hierbas, con el cultivo desarrollado, y la dosificación depende del desarrollo de aquellas. Se debe desecar el campo antes del tratamiento y volverlo a inundar al

día siguiente, manteniendo el nivel el mayor tiempo posible (15 días). Por otra parte, no se debe usar con temperaturas inferiores a 16°C y superiores a 32°C y hay que cuidar de que no llegue a cultivos como algodón, hortalizas, maíz, ornamentales, remolacha, soja, entre otros.

Tiene una DL_{50} oral, en rata, de 1400 mg kg⁻¹, y dérmica superior a 5000 mg Kg⁻¹, siendo el LMR de 0.1 : g mL⁻¹, para todos los productos vegetales.

Se sabe, además, que causa toxicidad aguda en los sistemas acuáticos [15]. Según unos estudios realizados, si se contamina agua de un lago con 0.5 mg mL⁻¹ de Propanil, éste es degradado en 160 horas [16], sin embargo, son muchos los que advierten de su toxicidad en los peces; el pez gato lo absorbe rápidamente y lo distribuye a sus tejidos. Su eliminación es bastante lenta, estando presente en esta especie 144 horas después de la exposición [17]. El nivel tóxico para el pez gato es de 6.1 mg L⁻¹.

En un estudio acerca de su toxicidad, [18] se comprobó que existen plantas presentes en las aguas que son capaces de "secuestrarlo" durante largos periodos de tiempo, unos dos meses, sin ocasionarles daño alguno. Este hecho hace pensar que si Propanil está presente en las aguas durante tanto tiempo, supone un gran peligro para los animales e incluso para los seres humanos que se alimentan directa o indirectamente de estas plantas.

Todos estos estudios toxicológicos demuestran el serio daño que causa este herbicida a los sistemas acuáticos y, en definitiva, a la cadena alimenticia, cuando éste pasa a las aguas, de ahí que sea de vital importancia su análisis y determinación.

Métodos de análisis

Dada la extensa bibliografía, en la que se recogen métodos de análisis de los herbicidas en estudio, a continuación, se resumen los métodos establecidos con detección fosforescente, en el caso de NAA y NAAM, y mediante fluorescencia fotoinducida, en el resto de los analitos.

ÁCIDO 1-NAFTILACÉTICO (NAA)

Los primeros métodos de determinación de esta fitohormona se llevan a cabo volumétricamente, pero pronto son desbancados por la espectrofotometría. Sin embargo, la técnica más empleada ha sido la cromatografía con detección fotométrica o fluorimétrica.

La fosforescencia también ha sido ampliamente empleada, inicialmente, a baja temperatura y, a partir de 1967, a temperatura ambiente, despertando un especial interés en los últimos años.

Las frutas son las principales matrices complejas sobre las que se aplican los métodos de determinación propuestos, tanto de NAA como de NAAM.

Ácido 1-naftilacético se determina en diferentes disolventes mediante fosforescencia a baja temperatura. Así, Moye y Winefordner [19], en 1965, estudian las características fosforescentes de varios pesticidas a baja temperatura (77K), en disolventes tales como EPA (dietiléter:isopentano:alcohol absoluto, 5:5:2, v/v), etanol absoluto o mezclas etanol-agua, determinando NAA en alimentos y fluidos biológicos.

En 1972, Sanders y Winefordner [20], en un estudio sobre las características fosforimétricas de reguladores del crecimiento de plantas, entre ellos NAA, a 77K y usando disoluciones de etanol absoluto. Observan que sólo 12 de ellos presentan posibilidades analíticas y proponen un método de determinación de NAA con límite de detección de 4×10^{-4} : g mL⁻¹.

Más tarde, los mismos autores [21] estudian las características fosforescentes a baja temperatura de 32 pesticidas en etanol:agua (10:90) como disolvente. Se propone un método de determinación de NAA por fosforescencia a 77K que presenta un límite de determinación de 0.2 : g mL⁻¹.

A partir de 1967, al introducir Roth [22] la fosforescencia a temperatura ambiente, resurgió de nuevo el interés por los métodos fosforimétricos. La RTP es observada en distintos soportes sólidos, de los que el papel de filtro es el más usado.

Por esta técnica, se estudia NAA en medio etanol:agua (10:90). Los máximos encontrados están próximos a los ya obtenidos para este compuesto a baja temperatura. La señal de fosforescencia resulta ser menos intensa que a baja temperatura, estableciéndose el límite de detección en 2 : g mL⁻¹ [21].

Aaron y Winefordner [23], utilizando el mismo soporte sólido y medio, estudian el efecto del átomo pesado sobre la emisión de RTP, usando NaI como átomo pesado externo. La presencia de NaI aumenta significativamente la señal de fosforescencia, ya que favorece el cruce de sistemas.

Se describe un sencillo sistema de muestreo para el estudio de la emisión de RTP de algunos pesticidas, entre ellos NAA [24]. Además, se recoge cómo influye la

presencia de distintos átomos pesados y papeles de filtro en la obtención de fosforescencia.

Asafu-Adjaye y Su [25], utilizando el sistema anterior, determinan NAA en mezclas sintéticas de pesticidas y sustancias tóxicas basándose en la medida de la señal RTP producida por la presencia de diferentes átomos pesados.

La RTP de NAA, en presencia de ciclodextrinas e inducida por 1,2-dibromoetano [26] o 1,2-dibromopropano, [27] como átomo pesado externo es estudiada por Zhang y col. En la misma línea, Muñoz de la Peña y col. [28] desarrollan un método fosforimétrico para la determinación de NAA mediante la formación de complejos de inclusión con β -CD. Las señales se obtuvieron en presencia de bromoalcoholes: 2-bromoetanol o 2,3-dibromopropanol, y empleando sulfito sódico, Na_2SO_3 , como desoxigenante químico.

En 1995, Xie y col. [29] realizan un estudio de fosforescencia sensibilizada de biacetilo, empleando NAA, en medio micelar.

Años más tarde, Segura Carretero y col. [30] determinan esta fitohormona en piña, en medios micelares, en presencia de $\text{Ti}(\text{I})$ y Na_2SO_3 . Las recuperaciones obtenidas son superiores al 98 %.

El mismo grupo [31], determina una serie de compuestos, NAA, entre ellos, mediante fosforescencia a temperatura ambiente, RTP, en medios no protegidos, inducida por la presencia de átomos pesados y desoxigenando las disoluciones con Na_2SO_3 .

NAFTALENACETAMIDA (NAAM)

La primera metodología propuesta para la determinación de esta fitohormona en muestras reales es la espectrofluorimetría, combinándose, después, con técnicas de derivación. La cromatografía líquida de alta resolución, con diferentes sistemas de detección, también se ha empleado para su análisis. En cambio, la fosforimetría no es empleada hasta los años 70.

Los primeros antecedentes de estudios fosforescentes de 1-naftalenacetamida datan de 1972, año en el que Sanders y col. [32] estudian las características fosforescentes de un amplio grupo de compuestos, entre ellos NAAM.

En 1979, Aaron y col. [23], realizan un estudio sobre el efecto del átomo pesado en la señal de RTP de diferentes pesticidas aromáticos, incluida NAAM, y comparan las características fosforescentes de varios de ellos.

Asafu-Adjaye y col. [33] estudian la fosforescencia de naftalenacetamida, entre otros, sobre papel y en presencia de Cl (I), I (I) y Pb (IV) como átomos pesados externos, realizando la resolución de las mezclas.

Los mismos autores, resuelven mezclas de NAA y NAAM junto con otros seis compuestos, mediante fosforescencia en soporte sólido [25]. En medio ácido y empleando papel, como soporte e NaI, como átomo pesado, los únicos componentes que presentan fosforescencia son NAA y NAAM, lo que permite su determinación.

En 1997, Segura Carreteo y col. [34] utilizan un diseño central compuesto para estudiar los factores que influyen en la respuesta fosforescente de NAAM, en medio

micelar y en presencia de TI (I) como átomo pesado. La desoxigenación se llevó a cabo por adición de Na_2SO_3 a la disolución. El método se aplicó a peras, consiguiendo recuperaciones del orden del 92 %.

Dos fitohormonas, entre las que se encuentra NAAM, son determinadas en suelos por los mismos autores [35], haciendo uso de microemulsiones y en presencia de TI (I) y Na_2SO_3 . Se empleó la técnica de derivada sincrónica de ángulo variable.

Recientemente, Cruces Blanco y col. [36] proponen un método de determinación mediante RTP inducido por átomos pesados. En este caso, la obtención de fosforescencia se consigue sin la presencia de medios organizados, siendo necesaria la adición de cantidades elevadas de átomo pesado.

FENILUREAS

Un análisis general de los métodos propuestos para la determinación de las fenilureas, pone de manifiesto que las técnicas más empleadas para este fin son la cromatografía líquida y la de gases. En menor medida, se emplea la electroforesis y las técnicas de inmunoafinidad, ELISA y fluoroinmunoensayos.

Las matrices reales más analizadas son agua y suelo y, en menor proporción, vegetales, frutas, orina y cereales.

Por lo general, las cuatro fenilureas en estudio suelen determinarse conjuntamente, o bien, en mezclas ternarias.

La primera aplicación de la PIF a la determinación de fenilureas data de 1982,

año en el que Werkhoven-Goewie y col. [37] la emplean acoplada a técnicas de HPLC. Proponen el análisis de siete herbicidas de la familia de las fenilureas, entre las que se encuentran Diurón, Linurón y Neburón.

Luchtefeld [38] propone la determinación de Diurón, Linurón y monurón en zanahorias, realizando una fotólisis post-columna seguida de una derivatización con ortoftalato-2-mercaptoetanol (OPA/MERC). El tiempo de fotólisis o irradiación es de 44 s, empleando como fase móvil acetonitrilo:agua, (MeCN):H₂O y encontrando límites de detección inferiores a 12, 24 y 4 ng mL⁻¹, respectivamente.

Miles y Moye [39] determinan una serie de compuestos, entre los que se encuentran las fenilureas, mediante HPLC con fotólisis post-columna para la formación de fluoróforos. Por otra parte, los hacen reaccionar con OPA-MERC para formar compuestos que emiten fluorescencia por sí solos. El método se aplica, satisfactoriamente, a la determinación de estas especies en agua subterránea y vegetales.

Los mismos autores, [40] empleando HPLC con derivatización post-columna con OPA-MERC y fotólisis seguido de detección fluorescente, estudian la señal presentada por una serie de pesticidas, entre ellos Diurón, Isoproturón, Linurón, Neburón y Propanil, determinando Neburón, entre otros, en agua subterránea. El tiempo de irradiación al que está sometidos cada analito es de 336 s, y el límite de detección para Neburón es de 0.8 ng mL⁻¹.

Recientemente, determinan herbicidas de la familia de las fenilureas en agua, empleando HPLC y derivatización post-columna utilizando un detector de diodos [41]

FENOXIÁCIDOS

El pesticida más ampliamente estudiado es 2,4-D que suele determinarse conjuntamente con 2,4,5-T. Con menos frecuencia, se encuentra con MCPA, MCPP, en mezcla de los cuatro o con algunas de las fenilureas en estudio.

Por su parte, MCPA y MCPP, además de las mezclas anteriormente citadas, se determina junto con Propanil con poca frecuencia.

Al igual que sucede con las fenilureas, el agua es la muestra real en la que más se aplica la determinación de los fenoxiácidos. En segundo lugar, se determinan en suelos y sedimentos, y en menor medida, en otros tipos de matrices, tales como fluidos biológicos, vegetales, formulaciones y frutas, entre otros.

Las técnicas más empleadas para su análisis son la cromatografía líquida y la de gases. La cromatografía en capa fina se emplea principalmente en los años 80, pero hoy en día está en desuso. Actualmente, la electroforesis está compitiendo con las técnicas cromatográficas, de modo que cada vez son más los trabajos en los que se emplea esta técnica. Por último, señalar que rara vez se utiliza la polarografía.

Karyakin [42] determina una serie de pesticidas clorados, entre ellos MCPA, en agua, haciéndolos reaccionar con Bi (III), en medio sulfúrico. La disolución resultante se expone a la radiación de una lámpara de mercurio durante 60-90 s. De ese modo, liberan átomos de cloro que reaccionan con Bi (III) y se forma BiCl_3 , cuya fluorescencia es la señal analítica. El límite de detección es de 200 ng mL^{-1} .

En la determinación de 2,4-D, 2,4,5-T y MCPP, en agua, mediante derivatización pre-columna con monodansilcadaverina, los productos resultantes se

separan en sílica gel y se detectan fluorimétricamente a 450 nm. Las recuperaciones obtenidas son 40, 92 y 63 %, para 2,4-D, 2,4,5-T y MCP, respectivamente [43].

En 1990, se describe un procedimiento en el que se determinan mediante cromatografía líquida 2,4-D, MCP y MCA [44], entre otros pesticidas, empleando tres tipos de detectores: UV, fluorescente y electroquímico. No es necesaria la derivatización antes del análisis y el método se aplica a la determinación de estos herbicidas en agua de río, obteniendo recuperaciones en torno al 80 %. Los límites de detección oscilan entre 20 y 90 ng L⁻¹.

Los mismos compuestos son determinados mediante HPLC con derivatización pre-columna, con 9-antrildiazometano, en agua subterránea [45]. Los productos obtenidos son detectados fluorimétricamente, encontrándose recuperaciones mayores del 93 %.

Tanaka y col. [46] determinan MCP en agua de río y agua subterránea, mediante HPLC con detección fluorescente. La derivatización pre-columna se lleva a cabo con 4-bromometil-6,7-dimetoxicumarina y 18-crown-6, para formar una especie fluorescente que detectan a 434 nm. El límite de detección es de 0.3 ng mL⁻¹ y las recuperaciones oscilan en torno al 90 %.

Un método de terminación de MCP, MCA, 2,4-D y 2,4,5-T en medio metanol:tampón de pH 5 y con tiempos de irradiación de 15 minutos es propuesto por Eremin y col. [47]. Los límites de detección oscilan entre 36-119 ng mL⁻¹ y aplican el método a la determinación de MCP en agua de río encontrando recuperaciones que oscilan entre 92 y 116 %.

Empleando stopped-flow [48], se determina MCPA, MCPP y MCPB en agua de río, tras 90 s de irradiación, mientras que en las mismas condiciones 2,4-D y 2,4-DP necesitan tiempos mayores, 760 s. Los métodos más sensibles son los correspondientes a los primeros compuestos.

García- Campaña y col. [49] determinan MCPP y 2-4-D en agua potable, empleando como medio micelar cloruro de cetiltrimetilamonio, CTAC. Los límites de detección son de 10.8 y 13.1 ng mL⁻¹, para 2,4-D y MCPP, respectivamente y las recuperaciones oscilan entre 93 y 100 %. Los mismos autores, combinando las técnicas de análisis por inyección en flujo (FIA) y PIF determinan los anteriores analitos, en medio micelar [50].

PROPANIL

La mayor parte de los métodos de determinación de este herbicida se llevan a cabo por cromatografía líquida de alta resolución, acoplada a un espectrómetro de masas, detector fluorescente, fotométrico, o de diodos.

Otra técnica empleada es la cromatografía de gases con detectores de nitrógeno fosforo, masas, ionización por impacto electrónico, captura electrónica, y últimamente, ionización química a presión atmosférica.

Son muy pocos los trabajos en los que se emplea amperometría, cromatografía en capa fina o fotometría convencional.

Este herbicida suele determinarse conjuntamente con Linurón, aunque, en ocasiones, también puede aparecer junto a Diurón, Isoproturón o Neburón y

raramente se determina con MCPA y MCPP o 2,4-D y 2,4,5-T.

Sin lugar a dudas, la muestra real que más se emplea para la determinación de Propanil es el agua, seguida del suelo y los sedimentos. Las menos empleadas son los vegetales, frutas, plantas y cereales.

Tanaka y col. [51] determinan Propanil, Linurón y Diurón empleando HPLC y detección UV. Para ello, hacen incidir radiación UV o luz del sol sobre las disoluciones, de modo que producen la fotólisis de estas especies y originan bifenilos halogenados. Éstos, además de ser detectados fotométricamente, también son identificados por espectrometría de masas.

Fenarimod, napronamida y Propanil [52] son determinados en aguas subterráneas mediante HPLC-PIF, sin derivatización, empleando acetonitrilo:H₂O como fase móvil, un tiempo de irradiación de 78 s y obteniendo límites de detección comprendidos entre 1.5 y 0.5 ng mL⁻¹. En las condiciones anteriores, pero con derivatización, se determinan los mismos pesticidas, encontrando menor sensibilidad.

I.A.6.- TERMINOLOGÍA ESPECÍFICA

Dado que en esta introducción se emplea un gran número de vocablos específicos del tema, que pudieran no ser familiares, para facilitar la comprensión de algunos de ellos se incluye, a continuación, una serie de definiciones.

Aditivos: aquellas sustancias tales como colorantes, repulsivos, eméticos y demás que, sin tener influencia en la eficacia de los plaguicidas, son utilizadas en la elaboración de los mismos con objeto de cumplir prescripciones reglamentarias u

otras finalidades.

Áfidos: insectos homópteros de la familia de los afídidos, comúnmente conocidos como pulgones de las plantas, en las que causan grandes daños por vivir parásitos a casi todas ellas. Se alimenta de la savia que succiona tras introducir en el tejido vegetal su larga y afilada trompa.

Coadyuvantes: sustancias tales como tensoactivos, fluidificantes, estabilizantes y demás, que son útiles en la elaboración de plaguicidas por su capacidad de modificar adecuadamente las propiedades físicas y químicas de los ingredientes activos.

Control: proceso por medio del cual se limita la infestación de malezas.

Clorótico: un tejido clorótico es aquel que presenta deficiencias metabólicas por falta de elementos nutritivos esenciales. También puede deberse a virus infecciosos que se transmiten con los injertos orgánicos y a veces, por la acción de los insectos.

Dosis letal media ,DL₅₀: cantidad de plaguicida necesaria para causar la muerte del 50 % de los individuos que componen la muestra de ensayo. Se expresan en miligramo de pesticida por kilogramo de animal tratado. Esta DL₅₀ puede hacer referencia a los siguientes tipos de toxicidades:

DL₅₀ oral aguda: se refiere a la ingesta, de una sola vez, de una cantidad determinada de tóxico.

DL₅₀ crónica: se define como los : g mL⁻¹ de tóxico presente en la dieta alimenticia, durante los días que se especifiquen, y que se producen los efectos que se señalan.

DL₅₀ dérmica: viene dada por la absorción de producto en estado puro, o en disolventes adecuados, situado mediante pincelación sobre la piel. El interés de este parámetro se encuentra en la importancia de la intoxicación por contacto en las

manipulaciones del pesticida.

Escarda: acción de desherbar, mecánica o químicamente

Erradicación: consiste en eliminar completamente de un área las plantas vivas y sus semillas. Es fundamental exterminar las semillas existentes en el suelo porque éstas pueden permanecer en él durante muchos años, gracias a una germinación retardada.

Formulación o preparado: plaguicida compuesto de una o varias sustancias o ingredientes activos, en proporción fija.

Helicidas: tipo de plaguicida que se aplica a los moluscos y más concretamente al caracol.

Ingestión diaria aceptable o admisible, IDA: dosis máxima diaria que se puede ingerir sin que ocasione daños detectables durante la vida de un ser. Se expresa en miligramos de producto tóxico ingerido diariamente por kilogramo del animal en experimentación.

Ingrediente activo-técnico: todo producto orgánico o inorgánico, natural, sintético o biológico, con determinada actividad plaguicida y grado de pureza establecido.

Ingredientes inertes: sustancias o materiales que, unidos a los ingredientes activos para la preparación de formulaciones, permiten modificar sus características de dosificación o aplicación.

Nivel permisible: máxima concentración de un plaguicida que puede contaminar un determinado alimento dispuesto para el consumo sin riesgo de toxicidad crónica. Se expresa en : g mL^{-1} .

Plazo de seguridad: periodo de tiempo que debe transcurrir desde la aplicación de un plaguicida a vegetales, animales o sus productos, hasta la recolección o aprovechamiento de los mismos o, en su caso, hasta la entrada en las áreas o

recintos tratados.

Prevención: evitar que determinadas especies contaminen un área. Es uno de los recursos más prácticos en el control de las malezas.

Tolerancia residual: concentración máxima permitida por las leyes de un país para un producto en un determinado alimento. Se expresa en : g mL⁻¹, generalmente oscila entre unas centésimas y 10 : g mL⁻¹, y no debe ser superior al nivel permisible. En algunas legislaciones se contempla la tolerancia cero, que se aplica a los plaguicidas de alta toxicidad y que indica que el compuesto en cuestión no debe encontrarse en cantidad alguna en el alimento a que se refiera.

I.A.7.- BIBLIOGRAFÍA

- [1] C. Glenn Klingman, M. Floyd Ashton. "Estudio de las plantas nocivas. Principios y prácticas". Editorial Limusa (1980)
- [2] "Química Agrícola 2. Plaguicidas y fitorreguladores". Editorial Alhambra Universidad (1990)
- [3] A. Karn, M. Goodrow, D. Schmidt, B. Hammack, M. Bigelow, J. Agric. Food Chem., 42 (1994) 301
- [4] W.E. Pereira, F.D. Hostettler, Environ. Sci. Technol., 27 (1993) 1542.
- [5] J.A. Goodrich, Jr. B.W. Lykins, R.M. Clark, J. Environ. Qual., 20 (1991) 707.
- [6] S. Chiron, A.R. Fernández-Alba, A. Rodríguez, Trends in Anal. Chem., 16 (1997)

518

- [7] C.S. Tucker, Bull. Environ. Contam. Toxicol., 39 (1987) 245
- [8] J.L. Villarias, "Guía de aplicaciones de herbicidas". Ediciones Mundi-Prensa (1981)
- [9] Pesticide Manual, 8th Edition, British Crop Protection Council (1987)
- [10] L. Detroux, J. Gostinchar, "Los herbicidas y su empleo". Ediciones Oikos-Tau, S.A. (1967)
- [11] R. Sigrist, A. Temperli, J. Hurter, J. Agr. Food Chem., 22 (1974) 568
- [12] W.P. Cochrane, M. Lanouette, R. Grant, J. Assoc. Off. Anal. Chem., 63 (1980) 145
- [13] M.C. Genaro, C. Abrigo, D. Giacosa, L. Rigotti, A. Liberatori, J. Chromatogr., 718 A (1995) 81
- [14] D. Barceló, S. Chiron, A. Fernández-Alba, A. Valverde, M.F. Alpendurada, en M.T. Meyer, E.M. Thurman (Editores), ACS Symposium Series N° 630 (1996)
- [15] Jr. Deuel, K.W. Brown, F.C. Tuner, D.G. Westfall, J.D. Price, J. Environ. Qual., 6 (1977) 127
- [16] I.E. Correa, W.C. Steen, Ground Water, 29 (1991) 225
- [17] D. Schlenk, C.T. Moore, Xenobiotica, 23 (1993) 1017
- [18] A. Perera, J.R. Burleigh, C.B. Davis, Agriculture, Ecosystems and Environment, 72 (1999) 255
- [19] H.A. Moye, J.D. Winefordner, J. Agric. Food Chem., 13 (1965) 533
- [20] L.B. Sanders, J.D. Winefordner, I bid, 20 (1972) 166
- [21] J.J. Aaron, E. M. Kaleel, J.D. Winefordner, I bid, 27 (1979) 1233
- [22] M. Roth, J. Chromatogr., 30 (1967) 276
- [23] J.J. Aaron, J. D. Winefordner, Analisis, 7 (1979) 168
- [24] S.Y. Su, E. Asafu-Adjaye, Ocak, Selma, Analyst, 109 (1984) 1019
- [25] S.Y. Su, E. Asafu-Adjaye, Anal Chem., 58 (1986) 539
- [26] S. Zhang, C. Liu, Y. Bu, Fenxi Huaxue, 16 (1988) 495
- [27] S. Zhang, C. Liu, Y. Bu, I bid, 16 (1988) 682

- [28] A. Muñoz de la Peña, F. Salinas, M.J. Gómez, M. Sánchez-Peña, I. Durán-Merás, *Talanta*, 40 (1993) 1657
- [29] J.W. Xie, J.G. Xu, G.Z. Chen, *Spectrochim. Acta A. Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 51 (1995) 1909
- [30] A. Segura Carretero, C. Cruces Blanco, F.A. Barrero, A. Fernández-Gutiérrez, *J. Agric. Food Chem.*, 46 (1998) 561
- [31] A. Segura Carretero, C. Cruces Blanco, B. Cañabate-Díaz, J.F. Fernández Sánchez, A. Fernández-Gutiérrez, *Anal. Chim. Acta*, 417 (2000) 19
- [32] G. R. Bear, C. W. Lawley, R. M. Riddle, *J. Chromatogr.*, 302 (1984) 65
- [33] E. B. Asafu-Adjaye, J. I. Yun, S. Y. Su, *Anal. Chem.*, 57 (1985) 904
- [34] A. Segura Carretero, C. Cruces Blanco, A. Fernández Gutiérrez, *Analyst*, 122 (1997) 563
- [35] A. Segura Carretero, C. Cruces Blanco, A. Fernández-Gutiérrez, *Ibid*, 122 (1997) 925
- [36] C. Cruces Blanco, A. Segura Carretero, M.I. Ramírez García, A. Fernández-Gutiérrez, *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 74 (1999) 377
- [37] C.E. Werkhoven-Goewie, W.M. Boon, A.J.J. Praat, R.W. Frei, U.A. Th. Brinkman, C.L. Little, *Chromatographia*, 16 (1982) 53
- [38] R.G. Luchtefeld, *J. Chromatogr. Sci.*, 23 (1985) 516
- [39] C.J. Miles, H.A. Moye, *Chromatographia*, 24 (1987) 628
- [40] C.J. Miles, H.A. Moye, *Anal. Chem.*, 60 (1988) 220
- [41] S.R. Ruberu, W.M. Draper, S.K. Perera, *J. Agric. Food Chem.*, 48 (2000) 4109
- [42] A.V. Karyvin, *Zh. Anal. Khim*, 39 (1984) 1518
- [43] U. Siegel, M. Schmitt, H. Jork, *J. Planar. Chromatogr. Mod. TLC.*, 2 (1989) 304
- [44] W. Schuessler, *Chromatographia*, 29 (1990) 24
- [45] T. Suzuki, S. Watanase, *J. Chromatogr.*, 541 (1991) 359
- [46] A. Tanaka, R. Mikuriya, R. Matumoto, Y. Yamozaiki, H. Morita, *Bunseki-Kagaku*,

42 (1993) 357

[47] S. Eremin, B. Laasis, J.J. Aaron, *Talanta*, 43 (1996) 295

[48] L.F. García, S. Eremin, J.J. Aaron, *Anal. Lett.*, 29 (1996) 1447

[49] A.M. García-Campaña, J.J. Aaron, *Luminescence*, 15 (2000) 110

[50] A.M. García-Campaña, J.J. Aaron, J.M. Bosque-Sendra, *Talanta*, 55 (2001) 531

[51] F.S. Tanaka, B.L. Hoffer, R.G. Wien, *Pestic. Sci.*, 16 (1985) 265

[52] C.J. Miles, *J. Chromatogr.*, 592 (1992) 283

I.B. - MEDIOS ORGANIZADOS

I.B.1.- Medios micelares

I.B.1.1.- Características y propiedades

I.B.1.2.- Aplicaciones analíticas

I.B.2.- Disoluciones acuosas de ciclodextrinas

I.B.2.1.- Estructura y propiedades de las ciclodextrinas

I.B.2.2.- Formación de complejos de inclusión

I.B.2.3.- Toxicidad

I.B.2.4.- Aplicaciones industriales y farmacéuticas

I.B.2.5.- Aplicaciones analíticas

I.B.3.- Bibliografía

La utilización de los llamados "medios organizados" o "medios ordenados", ha llegado a ser particularmente valiosa en la metodología analítica, debido a su capacidad de organizar los analitos a nivel molecular. Estos agregados moleculares o "anfitriones" moleculares son estructuras químicas microscópicas que, en ciertas condiciones, se aproximan a las características de disoluciones fluidas homogéneas.

En una estructura organizada, generalmente se encuentran dos regiones de distinta polaridad, y como resultado, pueden unirse o compartimentar analitos, dependiendo de la polaridad. En disolución acuosa, la unión se traduce en que el analito está "protegido" de aquellos componentes que se encuentran en el disolvente acuoso.

Sería muy extenso exponer todas las aplicaciones de estas especies en las distintas técnicas empleadas en Química Analítica, por ello, vamos a comentar de forma resumida sus propiedades, características y aplicaciones para centrarnos en el uso de estos medios en el desarrollo de métodos luminiscentes para la determinación de moléculas con actividad herbicida.

I.B.1.- MEDIOS MICELARES

I.B.1.1.- Características y propiedades

Los agentes de superficie activa, también llamados tensoactivos, son sustancias cuyas moléculas poseen una región hidrofílica y otra hidrofóbica, lo que les confieren propiedades específicas en disolución. La unión cabeza-cola hace que la micela posea tantos grupos polares como apolares y forme agregados que están en equilibrio dinámico con los monómeros que conforman la micela.

Generalmente, estas moléculas están formadas por una cadena hidrocarbonada de entre 8 y 18 átomos de carbono, que forman la región hidrofóbica o "cola" y un grupo polar o iónico que constituye la región hidrofílica o "cabeza".

Cuando la concentración de estas moléculas en disolución es superior a un valor característico, conocido como **concentración micelar crítica** (c.m.c), se asocian para formar agregados bien definidos que son las micelas. A menudo, la c.m.c. es considerada como una única concentración, sin embargo, se trata de una estrecha zona de concentraciones en la que se alteran las propiedades físicas de la disolución. De hecho, el cálculo de la c.m.c. se obtiene estudiando cómo varía la tensión superficial, la conductancia, etc, de la disolución del tensoactivo en función de la concentración del mismo.

La estructura de una micela es aproximadamente esférica a baja concentración de tensoactivo y cilíndrica o elipsoidal a altas concentraciones o en presencia de electrolitos [1]. Los grupos polares de cada molécula se disponen hacia fuera, en el seno de la disolución acuosa, mientras que las cadenas hidrocarbonadas están dirigidas hacia el interior de la micela formando un núcleo no polar o hidrófobo.

Cuando la concentración de tensoactivo es inferior a la c.m.c., éste se encuentra en forma de monómero, pero a medida que se aumenta la concentración del mismo y se alcanza la c.m.c se forman las micelas, que están constituidas por un número más o menos fijo de monómeros llamado **número de agregación**, entre 60 y 100, dependiendo del tensoactivo. La concentración de monómeros del tensoactivo en equilibrio con las micelas es aproximadamente constante e igual a la c.m.c. [2]. Así, un incremento en la concentración de tensoactivo por encima de la c.m.c. conduce a un incremento del número de micelas en disolución sin modificarse significativamente la concentración de monómeros libres. La concentración de micelas en disolución se puede calcular mediante la siguiente expresión:

$$\text{Micelas} = \frac{C_T - \text{c.m.c.}}{N}$$

donde C_T es la concentración total del agente micelar, c.m.c. es la concentración micelar crítica y N es el número de agregación.

En una micela iónica, el núcleo es líquido y está formado por la asociación de

las N cadenas hidrocarbonadas, en cuyos extremos se encuentran los grupos totalmente ionizados, dirigidos hacia la disolución acuosa.

En la Figura I.B.1 se representa un esquema de una micela iónica [3].

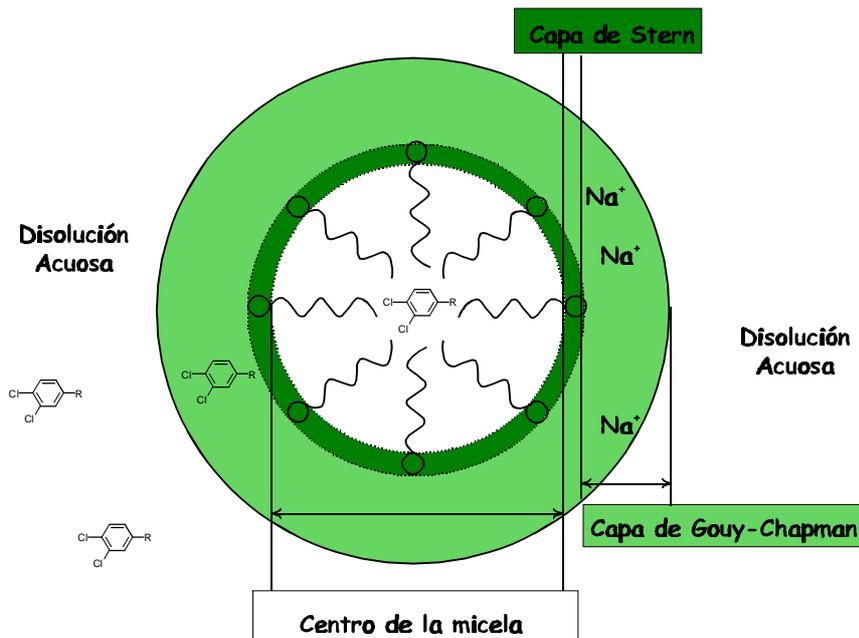


Figura I.B.1. - Esquema general de una micela iónica.

Los factores que determinan el valor de la c.m.c. de un tensoactivo, su número de agregación, el tamaño de las micelas, etc., son: la longitud de la cadena hidrocarbonada, el tamaño y estructura del grupo de cabeza, la naturaleza del contraión, la presencia de electrolitos, así como la temperatura. Para los tensoactivos iónicos, existe una temperatura denominada **punto de Kraft** que depende de la naturaleza del tensoactivo, por debajo de la cual, la solubilidad del monómero es inferior a la c.m.c. por lo que no existirán micelas por debajo de dicha temperatura. Para surfactantes no iónicos, a esta temperatura se le denomina **punto de nube**. Si una disolución micelar es enfriada por debajo de su correspondiente punto de nube, el tensoactivo precipita hasta que su concentración se iguale a su solubilidad a esa temperatura.

Si la micela posee dos colas, no se forman micelas sino bicapas o vesículas [4] tal y como se observa en la Figura I.B.2. La estructura de una vesícula en disolución acuosa se asemeja a dos esferas circunscritas con los grupos no polares formando una especie de doble capa que es no polar en su interior y polar en las dos caras externas, denominándose vesículas normales.

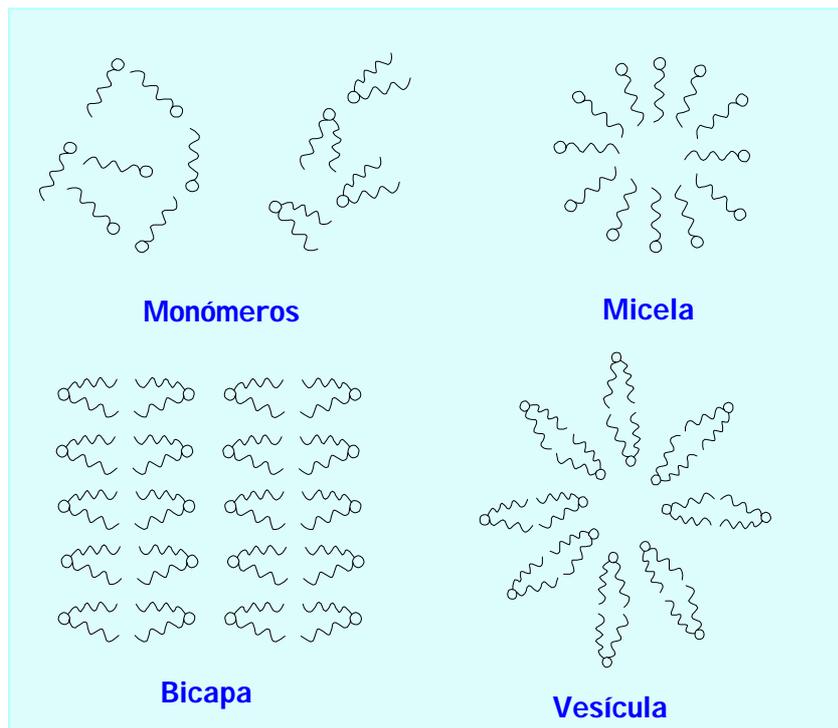


Figura I.B.2.- Tipos de agregados que forman los agentes micelares en disolución acuosa.

En medios orgánicos o hidro-orgánicos, se forman micelas inversas, las cabezas orientadas hacia el interior del agregado y las colas hacia el exterior quedando en contacto con el disolvente.

En función de la naturaleza del grupo polar, las micelas se clasifican en aniónicas, catiónicas, no-iónicas y anfóteras. Las **aniónicas** están constituidas

normalmente por sales de iones alcalinos y alcalinotérreos, de ácidos carboxílicos, sulfúrico y fosfórico, mientras que en las **catiónicas** el grupo polar es generalmente un amonio cuaternario neutralizado por un ión cloruro o bromuro. En cambio, en las **no-iónicas** los grupos polares de "cabeza" están formados usualmente por cadenas de polioxietileno o polioxopropileno.

Las micelas aniónicas son las más ampliamente utilizadas teniendo en cuenta su costo y aplicación. Las catiónicas son caras, pero su acción germicida las hace especialmente útiles para algunas aplicaciones. Por último, la ventaja que presentan las no-iónicas es que la longitud de los grupos hidrofílicos e hidrofóbicos puede variar.

En la Tabla I.B.1 se resumen algunas características de los tensoactivos más comúnmente utilizados, pertenecientes a cada uno de los grupos citados.

Tabla I.B.1. - Características de los surfactantes más empleados.

Nombre	Abreviatura	c.m.c. (M)	N ^a	r ^b (D)	IK ^c (°C)
Dodecil sulfato sódico	SDS	$8,1 \times 10^{-3}$	62	25	1622
Bromuro de cetiltrimetilamonio	CTAB	$9,2 \times 10^{-4}$	61	48	100
Eter polioxietilénlaurílico	Brij-35	-7×10^{-5}	40	>50	

^{a)} N° de agregación

^{b)} Radio

^{c)} Índice de Kraft

Actualmente, la geometría de la micela continua siendo objeto de debate. Aunque en un principio se consideraba a la micela como una gota de fase hidrofóbica en el seno de la disolución acuosa [5], actualmente, existe discrepancia acerca del nivel de penetración del agua en la micela [6]. Así, G. L. McIntire [7] recoge las distintas teorías que se tienen al respecto, Thomas [4] propone una penetración entre dos y cuatro átomos de carbono y Menger [8] sugiere una penetración más profunda del agua en el núcleo no polar.

Mediante medidas de fluorescencia polarizada se ha observado que el núcleo micelar se asemeja a un hidrocarburo líquido, con microviscosidades elevadas (entre 10 y 30 cP) [9] y que las cadenas hidrocarbonadas presentan un orden de mayor grado que el alcano del mismo número de átomos de carbono [10].

Con distintos experimentos llevados a cabo en medios micelares, Dill y col. [11] han comparado los diversos modelos teóricos de estructura micelar demostrando que el núcleo micelar se compone exclusivamente de segmentos de cadena hidrocarbonada distribuidos al azar, con las únicas condiciones limitantes de la continuidad de la cadena y los impedimentos estéricos. No obstante, otros modelos propuestos para la distribución radial no se ajustan a los resultados experimentales referidos [11].

Como conclusión de todas las investigaciones llevadas a cabo, el modelo actual sobre la estructura y características de las micelas se fundamenta en las predicciones de la teoría de las interfases estableciendo tres puntos básicos: existe un núcleo micelar hidrófobo prácticamente seco, rodeado de grupos polares. Las cadenas hidrocarbonadas en la micela muestran una distribución aleatoria y desordenada, siendo los condicionamientos estéricos y la simple continuidad de la cadena, los factores que determinarán la estructura micelar. Por último, debido al elevado desorden de las cadenas hidrocarbonadas, se produce una exposición o contacto importante entre las partes hidrófobas de la micela y el agua de la disolución en la interfase núcleo/superficie de la micela.

Resumiendo, se puede considerar, por tanto, a la micela como densa, desordenada y dinámica, con un núcleo seco y un considerable contacto con el agua de las cadenas hidrocarbonadas móviles en la zona superficial [11].

Los medios micelares presentan propiedades de gran interés para la Química Analítica. La más importante es su poder solubilizante sobre hidrocarburos, reactivos neutros, es decir, especies poco solubles o insolubles en fase acuosa.

La solubilización micelar es un proceso dinámico donde el soluto está en

equilibrio entre la micela y la fase acuosa [1]. Una solubilización adecuada implica que el soluto se localice, estadísticamente, la mayor parte del tiempo en el interior o en la superficie micelar [4]. Surge así el concepto de "tiempos medios de residencia" del soluto en la micela. En función de la naturaleza del soluto y la micela, existirán interacciones de tipo electrostático y/o hidrofóbicas entre ambos, por lo que pueden existir distintos lugares preferentes de solubilización [12].

Un soluto poco polar se situará preferentemente en las proximidades del medio micelar, mientras que, un soluto iónico, cuya carga sea contraria a la de la micela, se fijará en la superficie de la misma. En el caso de un soluto anfifílico, se alinearán con los monómeros que forman la micela, dirigiendo su grupo más polar hacia la superficie micelar, y la parte no polar o hidrófoba, hacia el núcleo de la micela.

Como consecuencia de la existencia de estos lugares de preferente solubilización, surge la segunda propiedad importante de los medios micelares, la capacidad de la micela para concentrar o separar reactivos. También puede aislar a uno de los reactivos del otro, separándolo e impidiendo que se de la reacción correspondiente. La solubilización selectiva de reactivos en la micela los acerca respecto a su situación en la disolución acuosa, favoreciéndose reacciones que en fase acuosa eran lentas.

Otra propiedad muy importante de las micelas es su capacidad de alterar el microentorno del soluto solubilizado, modificando parámetros tales como la constante dieléctrica, viscosidad, acidez, polaridad, etc., que cambian sustancialmente de la micela a la fase acuosa traduciéndose en cambios de equilibrio, propiedades espectrales y reactividad del soluto solubilizado [13].

El estudio de las propiedades espectrales, absorción, fluorescencia y fosforescencia, de distintas moléculas orgánicas en medios micelares permite obtener información muy valiosa sobre las propiedades de estos sistemas.

En general, el microentorno micelar ofrece una protección especial a los

estados excitados singlete y triplete de un molécula frente a procesos de atenuación o desactivación no radiante, observándose grandes aumentos en los rendimientos cuánticos de luminiscencia en el seno de un medio micelar [2,7]. La aplicación práctica de este fenómeno es enorme para la puesta a punto de nuevos métodos analíticos más sensibles. Resulta evidente, en este sentido, la necesidad de investigar y comprender la naturaleza de estos cambios espectrales, equilibrios y reacciones que se producen en el medio micelar, si estos conocimientos se quieren aplicar al desarrollo de nuevos métodos analíticos luminiscentes.

Otro efecto importante que influye sobre la luminiscencia es la capacidad del disolvente para formar puentes de hidrógeno solvatando, de alguna manera, a la molécula luminiscente. Dicho efecto ha de considerarse combinado con el cambio de la polaridad ya que están íntimamente relacionados.

Wolf [14, 15] comprobó que cuando la concentración de agente micelar se incrementa por encima de la c.m.c. del mismo, se reduce drásticamente el rendimiento cuántico de fluorescencia de la acridina.

En términos generales, cuando la concentración de agente micelar es ligeramente superior a la c.m.c. (baja concentración de micelas) y la concentración de luminóforo relativamente elevada, se favorece la formación de agregados, principalmente dímeros, que pueden ser luminiscentes o no. Si la concentración de agente micelar es muy superior a la c.m.c., el reactivo se diluye en las micelas de modo que, el número de micelas doblemente ocupadas por el analito, es despreciable. Por el contrario, cuando al concentración de agente micelar se encuentra por debajo de la c.m.c. se forman pares iónicos.

I.B.1.2. - Aplicaciones analíticas

Los medios micelares han sido empleados ampliamente para la obtención tanto de fluorescencia como de fosforescencia, al proporcionar a la especie fluorescente la protección necesaria de los estados excitados (singlete y triplete) de una molécula

frente a procesos de desactivación no radiante o atenuación.

Son numerosos los trabajos realizados en medios micelares para la obtención de fosforescencia a temperatura ambiente (RTP). El primero de ellos data de 1977, año en el que Kalyanasundaram y col. [16] obtienen señales de RTP de 1-bromonaftaleno y 1-bromopireno en disoluciones desoxigenadas de SDS. Esta técnica fue desarrollada por varios autores a principios de los años 80 [17-23].

Turro y col. [23] examinan los procesos fotofísicos de 1-cloronaftaleno en medio micelar, del mismo modo que lo hiciera Kalyanasundaram.

Hasta ese momento, la obtención de RTP en medio micelar (MS-RTP) se centraba en especies que poseían átomos pesados en su estructura. Pero, Cline Love y col. [18,21-25] obtienen MS-RTP de varios hidrocarburos aromáticos polinucleares y de derivados de drogas tales como propanolol y naproxén. Las señales de fosforescencia se producían en disoluciones micelares desoxigenadas de SDS, adicionando como átomo pesado Tl (I) o Ag (I). Otros autores, aplican el método propuesto a la determinación de estas especies en formulaciones farmacéuticas sólidas y líquidas [26].

Compuestos, tales como cetonas, aldehídos, alcoholes, ácidos carboxílicos, fenoles, aminas y un gran número de moléculas de interés terapéutico [19], empleando disoluciones micelares de dodecilsulfato de Na (I) o Tl (I). Los límites de detección son comparables a los obtenidos con fosforescencia a baja temperatura (LTP). Los mismos autores, en este caso, estudian el decaimiento de la fosforescencia que presenta fenantreno en disolución micelar [20].

Algunos iones metálicos, como Ga (III) o In (III), son determinados por MS-RTP al hacerlos reaccionar con ferrón para que formen los correspondientes complejos, en disoluciones de bromuro de hexadeciltrimetilamonio [27,28].

Normalmente, la desoxigenación de las disoluciones era llevada a cabo por paso

de nitrógeno a través de ellas. Sin embargo, este procedimiento era bastante problemático debido a la formación de espuma en la disolución. Así, Díaz García y col. [29] proponen el empleo de sulfito sódico, Na_2SO_3 , como desoxigenante químico, en lugar de nitrógeno. Este procedimiento fue aplicado a la determinación de Nb (V) [30], en presencia de bromoformo como átomo pesado externo, y de Al (III) [31,32], por formación de sus respectivos complejos con ferrón, en CTAB. Posteriormente, la determinación de Al (III) fue implantada en un sistema por inyección en flujo (FIA) [33].

Dos grupos de científicos chinos han llevado a cabo numerosas investigaciones empleando MS-RTP [34-40]. Así, Li y col. estudian la fosforescencia emitida por cloruro de dansilo [34] en disoluciones de SDS, empleando Tl (I), como átomo pesado. También han determinado la señal originada por aminoácidos y derivados de la etanolamina. Más tarde, empleando cloruro de dansilo, como marcador [35], determinan practolol, sustancia activa utilizada para tratar arritmias, y de la que los últimos datos demuestran que los pacientes tratados presentan ceguera y problemas de estómago, principalmente. Emplean la primera derivada para diferenciar los espectros debidos a practolol y a cloruro de dansilo, de modo que no es necesario efectuar ningún tipo de separación. Además, llevan a cabo un estudio de gran utilidad para la investigación de la estructura de las proteínas y su dinámica, empleando 8-anilil-naftalen-1-sulfonato (ANS) y 6-(p-toluidil-naftalen-2-sulfonato) (TNS), y estudiando la MS-RTP, en presencia de Tl (I) [36].

El otro grupo, estudia la RTP obtenida al introducir 8-bromonaftaleno en disoluciones micelares de un surfactante no iónico, Brij-35, en presencia de Tl (I) y Na_2SO_3 , para la desoxigenación de las disoluciones [37]. La adición de acetona atenúa la RTP, pero metanol y etanol parecen no interferir. Se compara el método propuesto con otro en el que se empleaba SDS, comprobándose la superioridad del surfactante Brij-35.

También determinan una serie de sustancias obtenidas de plantas y que se usan con fines terapéuticos, como emodín [38] y berberina [39], método que aplican

en plasma, empleando micelas inversas, o bien magnolol y honokiol [40], en disoluciones de SDS. Estudian, asimismo, la fosforescencia proporcionada por el ácido clorogénico [41], presente en numerosas medicinas chinas que inhiben las reacciones carcinógenas. Por otra parte, fue analizada la pérdida de intensidad que experimentaba pireno, mediante fosforescencia inducida por láser (LIP) [42].

En los últimos años, MS-RTP ha resultado ser bastante prometedora y son muchos los autores que la han empleado para la determinación de los más variados compuestos [2,43-48]. En ese sentido, Murillo Pulgarín y col. determinan nafronil [49], dipiridamol [50] y nafcilín [51] en preparados farmacéuticos.

Segura Carretero y col. utilizan la fosforescencia a temperatura ambiente, en medio micelar, para la determinación de NAAM en peras [52], de ácido β -naftoxiacético [53], fitohormona empleada como regulador del crecimiento de las plantas, de nafazolina [54], en Colirio Alfa y Euboral Oftálmico, de NAA [55] y tiabendazol [56].

Esta técnica puede ser muy útil en el análisis de mezclas de hidrocarburos por diferenciación de tiempos de vida de fosforescencia [21] o por espectroscopía de barrido sincrónico [25,57]. Por otra parte, en cromatografía líquida, son varios los trabajos que se han publicado en los que se usa MS-RTP como método de detección [24,58-61].

En 1994, empieza a emplearse una combinación de la metodología de flujo parado (stopped-flow) y MS-RTP. Los primeros trabajos son de Pandero y col. que determinan el insecticida carbaril [62] y el antiinflamatorio no esteroide, naproxén [63,64], en suero.

En los últimos años, el grupo de Muñoz de la Peña, en colaboración con el grupo de investigación de Murillo Pulgarín determinan, por esta técnica, nafronil [65] y dipiridamol [66].

Una alternativa para el análisis de RTP es la formación de microemulsiones, lo que origina otra metodología denominada fosforescencia a temperatura ambiente en microemulsiones (ME-RTP).

Las microemulsiones se forman espontáneamente cuando se mezclan cantidades apropiadas de agua, un disolvente no polar, un surfactante y un co-surfactante (generalmente un alquilalcohol C_4-C_6) [67]. Cuando el analito no polar se disuelve, en primer lugar, en una cierta cantidad de disolvente no polar y esta disolución es mezclada cuidadosamente con el alcohol y después, con la disolución acuosa de surfactante, se obtiene una microemulsión clara en pocos minutos.

Ramis Ramos y col. [68] obtienen RTP de algunos hidrocarburos estabilizándolos mediante el uso de microemulsiones en heptano-SDS-1-pentanol, comparan estas señales con las obtenidas en medios micelares, en papel y a baja temperatura, demostrando que son mayores en microemulsiones.

En 1994, Jin y col. [69] analizan los efectos producidos por el pH y la concentración de los reactivos en la obtención de RTP en microemulsiones de fenantreno y naftaleno, en presencia de TI (I) y Na_2SO_3 .

Otros analitos para los que se han propuesto estos métodos son carbaril [70] e hidrocarburos aromáticos policíclicos tales como naftaleno, fenantreno, acenafteno [71-73], naftalenacetamida y ácido 2-naftiloxiacético [74]. Del mismo modo, pero empleando derivada sincrónica de ángulo variable, se determinan acenafteno, fluoranteno benzoantraceno y benzopireno [75].

Una de las contribuciones más importantes de la fluorescencia al estudio de las micelas fue la determinación del número de agregación de éstas empleando un protocolo bastante simple [76]. Para obtener información sobre la localización de los solutos en las micelas [77], se han empleado compuestos fluorescentes, tales como hidrocarburos aromáticos [78,79], 1,3-dialquilindoles [80], 7-alcoxicumarina [81] y un derivado del cloruro de quinolicinio [82].

Otro de los trabajos en los que se emplea micelas no iónicas, Brij-35, es el de Cruces Blanco y col. [83], en el que analizan ácido fólico en preparados farmacéuticos.

Retinal y sus isómeros 9-cis y 13-cis, que no son fluorescentes en disolventes orgánicos, emiten fluorescencia a temperatura ambiente en diferentes medios micelares (SDS, CTAC, Brij-35 y Triton X-100). La señal fluorescente es similar a la obtenida en presencia de β -CD. En las mismas condiciones, retinol, retinal acetato y ácido retinoico también muestran fluorescencia [84,85].

La asociación de la luminiscencia y los medios micelares, (micelas directas, microemulsiones, micelas inversas) con el propósito de llevar a cabo análisis, no es reciente y ha dado lugar a numerosas publicaciones [86-90]. Así, se proponen simples análisis de pireno [91], aminoácidos [92] y muestras complejas, como los líquidos del carbón, basados en un aumento de la fluorescencia. Con esta última muestra, se comparan la eficiencia de las micelas convencionales con la de las micelas de sales biliares para la separación del analito de la matriz compleja que lo rodea. Se observa que el medio de sales biliares aumenta la sensibilidad y el rango dinámico en el que se puede medir la fluorescencia [93].

Para el análisis de los iones metálicos, también se ha hecho uso de los medios organizados encontrando elevados aumentos de la señal fluorescente cuando se formaban complejos metálicos. En ese sentido, se emplearon iones lantánidos para determinar analitos orgánicos, empleando micelas inversas [94]; se determinó Zn (II) a niveles traza [95] y se observó un aumento de la sensibilidad, en presencia de surfactantes, cuando se determinó Al (III) al complejarse con morina [96].

Recientemente, se han publicado trabajos en los que las ciclodextrinas y los medios micelares aparecen mezclados. Los resultados muestran que existe una interacción entre ambos componentes en ausencia de un analito potencial, dando como resultado una variación de la c.m.c. hacia concentraciones superiores de surfactante. Este ensayo se realizó con Triton X-100, con varias ciclodextrinas y aprovechando la fluorescencia de TNS [97]. En presencia de 10 mM de β -CD, la c.m.c. es aumentada

28 veces, mientras que la presencia de " -CD, parece no afectar. Algo similar sucedió al añadir \$-CD en disoluciones de CTAB [98].

Las aplicaciones que se llevan a cabo empleando técnicas de separación con detección fluorescente son numerosas y han sido recogidas por Baeyens en un review [99]. Aunque el empleo de medios micelares en cromatografía no es algo nuevo [100], ha sido en los últimos años cuando más se han utilizado. Así, se determinan esteroides en orina empleando HPLC y micelas [101] y la luminiscencia de los lantánidos sensibilizados es aprovechada para la determinación de teofilina por cromatografía líquida [102], donde se produce una transferencia de energía del estado triplete desde el analito al ión Tb (III), en presencia de medios micelares.

En esa misma línea, Djurdjevic y col. [103] determinan el agente antibacteriano sintético, feroxacina, de la familia de las quinolonas, en suero humano, empleando disoluciones micelares de SDS.

Por último, señalar que estos medios también se han empleado en la técnica de fluorescencia inducida fotoquímicamente (PIF). Así, Muñoz de la Peña y col. [104] determinan herbicidas pertenecientes al grupo de las fenilureas, tales como Diurón, I soproturón, Linurón y Neburón en medios micelares. Comparan las señales obtenidas en varios medios y aplican el método propuesto a la determinación de residuos de estas especies en agua de río. Esta técnica se tratará en más profundidad en el apartado I.D.

En este mismo año, García Campaña y col. [105], combinando el análisis por inyección en flujo (FIA) con PIF, determinan MCP y 2-4-D, en medios micelares de CTAC. Aplican el método propuesto a la determinación de estos analitos en agua potable, consiguiendo recuperaciones que oscilan entre 97 y 108 %.

I.B.2. - CICLODEXTRINAS

I.B.2.1. - Estructura y propiedades

En 1891 Villiers aísla, del *Bacillus Macerans*, un grupo de oligosacáridos, inusuales, no reductores, que crecen en un medio rico en amilosa, como productos de degradación del almidón. Pero no fue hasta 1904 cuando Schardinger llevó a cabo la elucidación de la estructura de estos compuestos, resultando ser oligosacáridos cíclicos que contenían de 6 a 11 unidades de glucosa. Por esta razón, algunos autores, sobre todo en la literatura antigua, denominan a las ciclodextrinas (CDs), cicloamilosas o dextrinas Schardinger [106].

En 1938, Freudenberg y col. observan que las CDs están construidas por uniones " [1 ÷ 4] de unidades de glucosa. Sin embargo, los pesos moleculares de las ciclodextrinas más comúnmente utilizadas, " , \$ y (no fueron determinados hasta mucho más tarde. Freudenberg descubre que estas moléculas podían formar compuestos de inclusión y, al igual que French y col. ponen a punto procedimientos para la síntesis de CDs puras.

La formación de los complejos ciclodextrina:huésped fue estudiada metódicamente por Cramer y col. demostrando que las ciclodextrinas son moléculas rígidas que se comportan como anfitriones moleculares en la formación de complejos de inclusión [106].

La hélice de almidón se hidroliza por enzimas que no son específicas al lugar de la hidrólisis, por lo que el producto resultante contiene " , \$, (y *-CD con 6, 7, 8 y 9 unidades de glucosa, respectivamente y, en menor cantidad, ciclodextrinas con 10-13 unidades de glucosa, que fueron identificadas por métodos cromatográficos [107]. En cambio, las constituidas por menos de 6 unidades de glucosa no se sabe que existan debido a los impedimentos estéricos.

Las tres ciclodextrinas más interesantes desde el punto de vista analítico son la " -, \$- y (-ciclodextrina, y pueden ser aisladas mediante precipitación selectiva o cromatografía de adsorción. Las estructuras químicas de estas tres ciclodextrinas se representan en la Figura I.B.3.

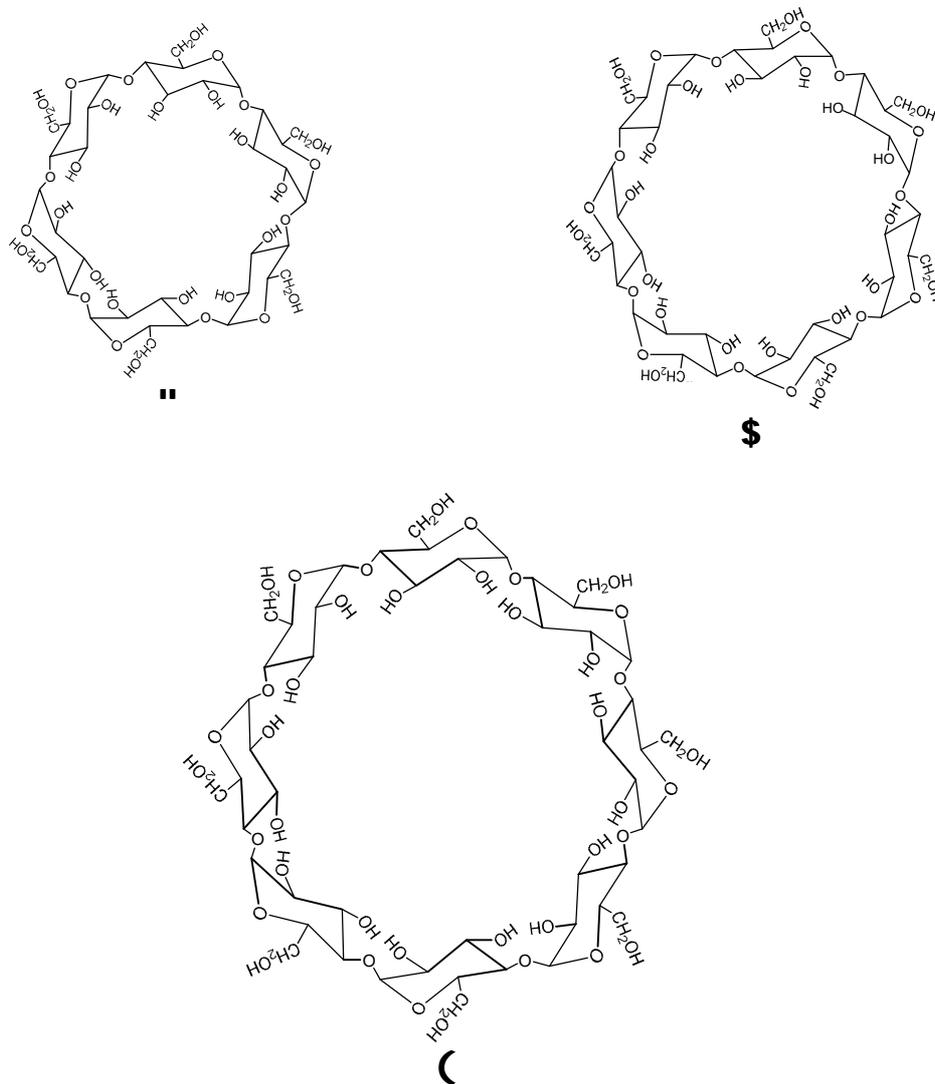


Figura I.B.3.- Estructuras químicas de " -, \$- y C-ciclodextrina

Los diámetros de las cavidades de estos oligosacáridos cíclicos dependen del número de unidades de glucosa que componen cada ciclodextrina. Los valores de sus diámetros, junto con otros datos físicos, se recogen en la Tabla I.B.2.

Tabla I.B.2.- Datos físicos sobre las ciclodextrinas

	"	\$	⊂
Masa molecular	972,8	1135	1297
Diámetro de la cavidad (D)	5,7	7,8	9,5
Volumen de la cavidad (D ³)	176	346	510
Anchura (D)	13,7	15,3	16,9
Altura (D)	7,9 ± 0,1	7,9 ± 0,1	7,9 ± 0,1
Solubilidad en agua (g/100 mL)	14,5	1,85	23,2
Valores de pK _a	12,3	12,2	12,1
Nº de moléculas de agua incluidas	6	11	17

Hay que destacar la baja solubilidad de la \$-CD en comparación con las otras. Como se observa en la Tabla, 100 mL de agua disuelven 14.5 g de "-CD, 23.2 g de ⊂-CD y tan sólo 1.85 g de \$-CD, a temperatura ambiente.

En cuanto a su estabilidad, hay que resaltar que son muy estables en medio alcalino pero se hidrolizan en medios fuertemente ácidos [108]. La estabilidad hacia la hidrólisis ácida depende de la temperatura y de la acidez del medio. Las constantes de velocidad de hidrólisis varían sensiblemente. En términos generales, se puede decir que a pH superiores a 3.5 y T^a inferior a 60 °C las CDs son bastante estables.

Por otra parte, aunque bajo radiación γ puede suceder la rotura de los enlaces 1,4 glicosídicos, las formas cristalinas de β y α -CD suelen ser bastante resistentes a la luz dentro de los rangos UV-visible e IR [108].

Los productos de la reacción que tiene lugar entre la enzima ciclodextrina transglucosilasa (CTG) y una solución de almidón pretratada con α -amilasa son α , β y γ -CD, con 6, 7 y 8 unidades de glucosa, respectivamente. De todas ellas, la β -CD es el producto mayoritario.

Dadas las adecuadas dimensiones para incluir moléculas relativamente grandes en su interior, la más empleada de las ciclodextrinas y por tanto la más interesante desde el punto de vista analítico es la β -CD. Si también se tiene en cuenta el precio, entonces no hay duda que es el agente complejante de fármacos más prometedor. Por contra, α -CD suele ser empleada para moléculas pequeñas, mientras que γ -CD sólo podría utilizarse con moléculas grandes del tipo de los esteroides [109] o antibióticos [110], siendo su coste demasiado elevado.

Aunque la cavidad de γ -CD es mayor que la de β -CD, la energía de estabilización resultante tanto de la expulsión del agua como de la inclusión del analito, es mayor para β que para γ -CD. Como resultado de ello, los complejos de inclusión formados con β -CD son generalmente más estables [111]

La β -CD presenta, no obstante, ciertas limitaciones en su utilización. De una parte, su baja solubilidad, aunque se produzca un aumento de la solubilidad de los analitos al formar complejos. De otra, presenta una elevada tendencia a cristalizar, así, cuando se administra parentalmente, no se metaboliza y se acumula en el riñón como complejos cristalinos insolubles de colesterol, dando lugar a severos síntomas nefrotóxicos [111]. Por estas razones, la β -CD, antes de ser usada, debe ser modificada para mejorar su solubilidad y limitar su elevada tendencia a cristalizar.

Estos hechos han dado lugar a numerosas β -CDs en las que las modificaciones más frecuentes son: la sustitución del átomo de H de uno de los grupos hidroxilos

primarios o secundarios, sustitución de uno o más grupos hidroxilos primarios o secundarios, eliminación de los átomos de H de los grupos $-\text{CH}_2\text{OH}$, convirtiéndolos en $-\text{COOH}$ o rotura de uno o más enlaces C_2-C_3 a través de un proceso de oxidación.

El esquema funcional de la molécula de ciclodextrina se muestra en la Figura I.B.4. Su característica forma de toroide es debida a la conformación tipo C_1 de los residuos individuales de glucosa [106,112] y sus enlaces en posición " " $-(1,4)$. Debido a la aparente falta de rotación libre alrededor del enlace glicosídico que conecta las unidades de glucosa, las ciclodextrinas no son moléculas perfectamente cilíndricas, sino que tienen forma de cono. La cara 6-hidroxil es el lado más estrecho, mientras que la 2,3-hidroxil es algo más ancha.

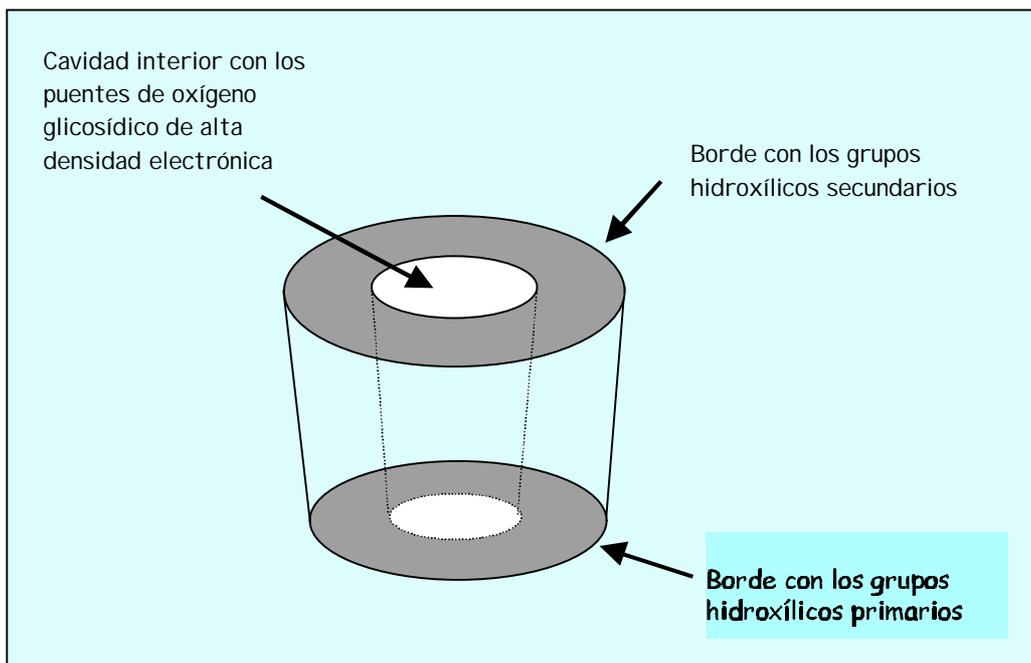


Figura I.B.4. - Esquema funcional de la molécula de ciclodextrina.

Los grupos hidroxílicos primarios y secundarios, localizados en los extremos opuestos de la cavidad, y los puentes de oxígeno glicosídico que la revisten interiormente, dan a la molécula de CD dos regiones de diferente polaridad [106,112,113] y dependiendo de ésta, pueden unirse a distintos analitos. En disolución

acuosa, la unión se traduce en que el analito está protegido de aquellos componentes que se encuentran en el disolvente acuoso. En muchos casos, las solubilidades en agua de especies hidrofóbicas aumentan debido a este proceso de complejación.

La naturaleza hidrofílica del exterior de la ciclodextrina aumenta por los grupos hidroxílicos. Puentes de hidrógeno intramoleculares, entre los grupos hidroxílicos de los carbonos C_2 y C_3' de las moléculas adyacentes de glucosa, estabilizan la forma de la ciclodextrina, y contribuyen a la naturaleza hidrofílica de ésta. En consecuencia, estas moléculas son bastante solubles en agua.

Por el contrario, el interior de la ciclodextrina es algo no polar, debido a la alta densidad electrónica de los puentes de oxígeno. Esta naturaleza no polar de la cavidad, les hace ser un medio atractivo para especies moleculares hidrofóbicas. Esta polaridad de la cavidad ha sido comparada con la del etanol, habiéndose comprobado que la adición de una pequeña cantidad de este alcohol a disoluciones acuosas de ciclodextrina, incrementa la solubilidad de las mismas [114].

En disolución acuosa, pueden residir varias moléculas de agua en la cavidad de la ciclodextrina (Tabla I.B.2). Estudios de difracción neutrónica y de rayos X, del complejo cristalino " -CD:agua, muestran que la presencia de agua altera la conformación usual del macrociclo. Los puentes de hidrógeno formados entre el agua incluida y los puentes de oxígeno glicosídico, distorsionan los puentes de hidrógeno intramoleculares normales de la ciclodextrina y, en consecuencia, aumenta la tensión del anillo. Esta tensión viene acompañada por un aumento en la energía del sistema. Por otra parte, estudios espectroscópicos de las CDs en medio acuoso sugieren que la conformación de las CDs en disolución es casi idéntica a la que tienen en estado cristalino.

I.B.2.2. - Formación de complejos de inclusión

En la Figura I.B.5 se representa esquemáticamente el proceso de formación de un complejo de inclusión en \$-ciclodextrina, en disolución acuosa [113].

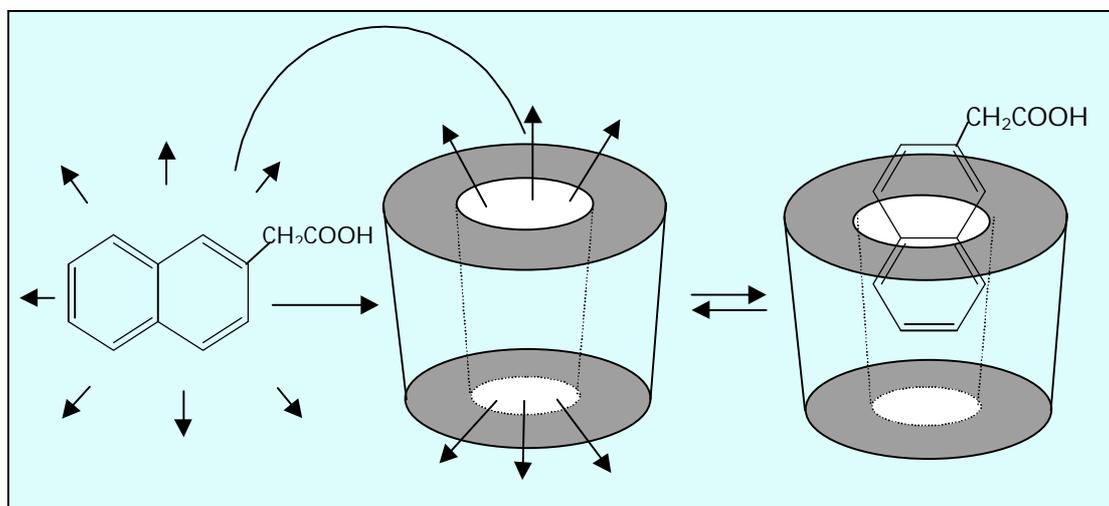


Figura I.B.5. - Proceso de formación de un complejo de inclusión en α -CD.

La sustitución del agua por un compuesto hidrofóbico, analito, está favorecida al disminuir la tensión del anillo cuando el compuesto incluido restituye su configuración normal de puentes de hidrógeno intramoleculares. La complejación, por tanto, es consecuencia de varios factores que incluyen la disminución de la tensión del anillo después de la inclusión del analito y la expulsión de la cavidad de las moléculas de agua altamente energéticas [106,112].

Por otra parte, si se la compara con la hidratación de los componentes individuales, la hidratación del complejo de ciclodextrina está favorecida energéticamente. Aún cuando durante el proceso de complejación no se formen enlaces covalentes, pueden ocurrir interacciones de Van der Waals y originarse enlaces por puentes de hidrógeno entre la ciclodextrina y la molécula incluida. Estas débiles interacciones, en combinación con el hecho de que el proceso de complejación es favorable desde el punto de vista energético dan generalmente lugar, para una variedad de moléculas orgánicas, a constantes de estabilidad comprendidas entre 100 y 5.000 M^{-1} .

El grado de complejación entre la ciclodextrina y la molécula que se incluye

depende de la compatibilidad del tamaño de la cavidad de la ciclodextrina y el tamaño y forma del compuesto incluido.

Así, un compuesto demasiado grande como para poder incluirse en α -CD, puede tener tamaño apropiado para ser incluido en la cavidad de una β -CD, que es mayor. Igualmente, una molécula que sea demasiado grande para incluirse dentro de β -CD, puede ser compatible con el tamaño de γ -CD. Cuando el analito, dado su tamaño, no puede incluirse por completo, su porción hidrofóbica compatible puede hacerlo en la CD y la parte no incluida puede participar en la formación de puentes de hidrógeno con los grupos hidroxílicos de la ciclodextrina si esto es posible.

En la Figura I.B.6 se representan esquemáticamente las dimensiones comparativas de las tres ciclodextrinas más utilizadas [112].

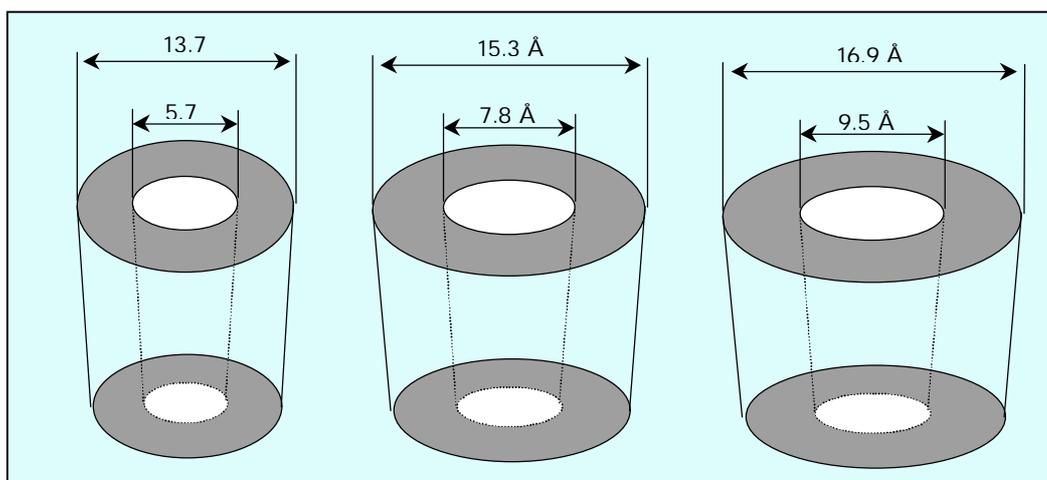


Figura I.B.6. - Dimensiones comparativas de α -, β - y γ -CD.

La orientación de la molécula invitada en la cavidad está relacionada con su hidrofobicidad y geometría. Así, se ha demostrado que derivados del naftaleno con varios sustituyentes, tienen diferentes orientaciones en la cavidad de β -CD. Éstas vienen determinadas por la polaridad y lugar en el que se encuentre el grupo sustituyente, así como por el tamaño molecular del compuesto incluido [115].

La complejación sólo sucede en disolución y, dado que la solubilidad de la CD aumenta con la temperatura, el empleo de altas temperaturas permite alcanzar una gran concentración inicial de S -CD. Por otra parte, la mayoría de los complejos formados tienen una solubilidad muy limitada y normalmente cristalizan a temperatura ambiente.

Otro aspecto importante cuando se examinan estos complejos de inclusión es la estequiometría, ya que se han observado estequiometrías diferentes a la 1:1. Entre los casos que se dan en disolución acuosa, se encuentran los complejos de estequiometría 1:2, en los cuales dos moléculas de analito residen en una cavidad de la ciclodextrina, así como complejos de estequiometría 2:1 en los que dos moléculas de ciclodextrina encapsulan una molécula de analito [112,116]. También pueden formarse complejos ternarios, en los que dos compuestos diferentes se incluyen en la cavidad de una ciclodextrina. Así, se ha demostrado que una molécula de éter dietílico y una de antraceno pueden residir simultáneamente en la cavidad de S -CD [112]. La determinación de la estequiometría del complejo es crucial para una cuantificación precisa de las constantes de formación.

Dado que el proceso de complejación implica una interacción estereo-selectiva, que produce una protección de la especie que se incluye, las CDs se han utilizado en la industria farmacéutica para encapsular drogas sensibles a la luz y aumentar la solubilidad de drogas moleculares hidrofóbicas [113].

En procesos de separación, las ciclodextrinas se han empleado para mejorar la resolución de enantiómeros en cromatografía en fase inversa, empleándolas como fases móviles [117] o bien columnas de fases enlazadas de éstas [118,119], así como para catalizar reacciones estereo-selectivamente [120].

Con respecto a otros medios organizados, tales como las micelas, las ciclodextrinas presentan varias propiedades deseables desde un punto de vista analítico: no es necesaria una concentración crítica para incluir moléculas en su interior, son estables en un amplio rango de pH y resistentes a la luz, presentan muy

poca o ninguna absorción en la región UV y no son tóxicas ni forman espuma cuando se desoxigenan mediante el paso de un gas.

Otra de sus propiedades, es la de intensificar las señales de fluorescencia y de fosforescencia de diferentes luminóforos, lo que las hace particularmente útiles, desde el punto de vista analítico, en el desarrollo y optimización de métodos de determinación mediante luminiscencia molecular.

La intensificación de los procesos luminiscentes se debe a que las moléculas que se introducen en la cavidad interna de las ciclodextrinas se aíslan del ambiente que las rodea y sus estados excitados están más protegidos de los procesos de atenuación o "quenching" de fluorescencia y de otros procesos de decaimiento no radiante que ocurren en disolución. La inclusión causa restricción en la movilidad molecular y/o alteraciones en la polaridad local. Así, han sido utilizadas para incrementar las intensidades de fluorescencia de varios compuestos orgánicos mediante un proceso de encapsulamiento parcial o de inclusión. El proceso, además, provoca generalmente un cambio del máximo de emisión hacia longitudes de onda más bajas y un cambio del espectro de absorción hacia longitudes de onda más altas.

Las principales ventajas, que pueden derivarse de este hecho, son el incremento de la eficiencia del fenómeno de emisión, la ganancia de sensibilidad, el uso de un medio acuoso para realizar la determinación, y la prevención de reacciones laterales que pueden conducir a interferencias por parte de la disolución. Una de las más importantes aplicaciones potenciales de las ciclodextrinas es la protección de la molécula incluida del efecto de oxidación y de degradación fotoquímica.

I.B.2.3.- Toxicidad

El metabolismo de degradación de las ciclodextrinas y del almidón es comparable, aunque no son metabolizadas tan rápidamente debido a que son degradadas por la " -1,4-gluconohidrasa más lentamente que las dextrinas lineales [121], y tampoco son hidrolizadas por las enzimas que actúan sobre los grupos

terminales.

En 1957, se publicaba que la administración oral de estos compuestos era altamente tóxica [121]. Estudios toxicológicos y metabólicos más detallados fueron llevados a cabo en ratas y perros, encontrándose que eran falsas estas primeras publicaciones. A partir de entonces, las legislaciones sanitarias de muchos países autorizaron su uso en alimentos. Las fechas de legalización y utilización varía de unos países a otros. En 1978, se legalizan en Japón y en 1983 en Hungría como estabilizante de sabores. Francia, como soporte de aromas, Holanda, Bélgica y Luxemburgo lo hacen en 1986. Un año después, son empleadas por España, en alimentos, por Estados Unidos, en los chicles, y por Alemania en fármacos.

De acuerdo con los informes de la FAO (Food Agriculture Organization), el almidón modificado enzimáticamente, lo que incluye a las CDs, es inocuo para el consumo humano. De hecho, se han efectuado diversos estudios enzimáticos y toxicológicos con el fin de comprobar cómo actúan éstas al incorporarse a la ruta metabólica del ser vivo.

Cuando son administradas oralmente, íntegras, sólo se absorben cantidades insignificantes a través de la región intestinal. La mayor parte de la CD absorbida es metabolizada en el colon por la microflora bacteriana. Los metabolitos primarios, maltodextrinas acíclicas, maltosa y glucosa, son además metabolizados y absorbidos de la misma forma que el almidón y excretados como CO₂ y H₂O.

La diferencia principal entre el metabolismo del almidón y de las CDs es que el primero es metabolizado en el intestino delgado y las segundas en el colon. Las intensidades máximas de los metabolitos se observan aproximadamente 1-2 horas después de su consumo, en el caso del almidón y de 6-8 horas, en el caso de las CDs.

I.B.2.4. - Aplicaciones industriales y farmacéuticas

Los complejos que se forman con CDs son de interés para la investigación

científica dado que, mientras que los clatratos clásicos no existen en disolución acuosa, las CDs sí y, por tanto, pueden ser usadas para estudiar las interacciones hidrofóbicas tan importantes en los sistemas biológicos.

Son varios los usos de las CDs. Pueden ser empleadas ventajosamente en la producción de fármacos, pesticidas, comestibles y artículos de aseo. Los compuestos de interés, encerrados dentro de sus cavidades, se encuentran protegidos de los efectos de la luz y la atmósfera, pueden ser manejados fácilmente y almacenados en forma de polvos.

De otra parte, sustancias que no son solubles en agua, llegan a serlo en presencia de CDs. Cremas y emulsiones pueden ser estabilizadas, y el crecimiento y rendimiento de las cosechas de grano, puede ser aumentado.

En cuanto a las aplicaciones farmacéuticas, hay dos importantes áreas de aplicación de β -CD: Aumento en la biodisponibilidad de algunas drogas y protección de sustancias contra la oxidación, descomposición, hidrólisis, etc [122].

En agroquímica, el hecho de que muchos pesticidas, herbicidas, insecticidas y fungicidas pueden formar complejos con β -CD, se aprovecha debido a las diferentes ventajas que conlleva [123]. Así, se consigue un efecto de estabilización de sustancias que son biodegradables, sensibles a la luz, al calor, oxígeno y a iones, llegando a ser compatibles con otros constituyentes en las formulaciones agroquímicas.

Se reduce la volatilidad y el mal olor en líquidos volátiles de sustancias cristalinas sublimables que pueden ser transformados en polvos sólidos estables. Por otra parte, hay muchas sustancias que tienen un olor muy desagradable, pero cuando son complejadas, el producto obtenido es prácticamente inodoro y su efecto biológico sigue siendo el mismo.

Llegan a ser solubles sustancias poco mojables y escasamente solubles, cuando

se incluyen en la cavidad de la CD, mejorando así su biodisponibilidad y permitiendo una mayor efectividad empleando dosis más pequeñas, lo que implica una reducción en el coste, cuando se trabaja con sustancias costosas.

Normalmente, los desinfectantes empleados en suelos se aplican cuando la tierra está seca y puede ser tratada con máquinas. El pesticida complejado se pone en libertad cuando dicho complejo entra en contacto con la lluvia, momento exacto en el que ejerce su máximo efecto, pues la posibilidad de matar los insectos es más favorable en suelos húmedos que en secos.

La efectividad biológica de insecticidas sólidos que se usan en suspensión, aumenta al disminuir el tamaño de las partículas. Reducir el tamaño de éstas es un procedimiento costoso que implica un consumo energético y, a veces, sin éxito al permanecer las partículas unidas como resultado de la carga eléctrica. Sin embargo, los complejos formados con las CDs no experimentan carga eléctrica, de ahí su importancia.

Otros campos de aplicación de estos compuestos son los alimentos, cosméticos y tabaco. Muchos ingredientes de comestibles no pueden ser usados en productos procesados. Acciones como cocinar, hornear o freír, destruyen muchos sabores, colores naturales y vitaminas. La naturaleza inestable de estos ingredientes, a menudo restringe el tiempo de durabilidad antes de la venta del producto en el que se incluyen. En cambio, los complejos de β -CD con aceites esenciales, saborizantes, vitaminas y colores naturales son estables. La complejación previene la evaporación y el ataque del oxígeno y los elementos químicos.

El olor fuerte de muchas sustancias, tales como el aceite de cebolla, de ajo o las piracinas limitan su uso. Los complejos formados con este tipo de compuestos son fáciles de usar y almacenar, no van a ser destruidos en la elaboración del producto y liberarán a su huésped, el aceite, en la humedad de la boca para que el sabor pueda apreciarse.

Se emplean también ciclodextrinas para aumentar las propiedades organolépticas de los chicles, aumentando el tiempo de permanencia de los aromas gracias a su interacción con el aceite de menta verde. Esta aplicación no sólo es importante desde el punto de vista industrial sino también farmacéutico, ya que con él se consigue enmascarar durante mayor tiempo el mal sabor de algunos medicamentos, potenciando por otro lado el buen sabor que se origina al emplear el aceite de menta verde.

Se han propuesto gran número de aplicaciones de cosméticos que forman complejos con CDs. El más obvio es el uso de complejos que perfuman los polvos de talco. Hay otra aplicación similar en la que el material es contenido en el complejo estable y protegido hasta que entra en contacto con un fluido biológico.

Los saborizantes del tabaco, rociados o espolvoreados sobre este producto, son de naturaleza muy volátil y se pierden durante el procesado y almacenamiento. Complejados con β -CD permanecen inalterables en la mezcla de tabaco hasta que son liberadas por ignición.

Casi todas las aplicaciones de estos compuestos, en formulaciones de fármacos, implican una complejación. En muchos casos, el complejo es el estado final y es refinado hacia una forma más o menos pura para ser usada como sustancia cristalina en dosis sólidas de fármacos, como potenciadores del sabor. En algunos casos, sin embargo, el proceso de complejación es sólo un estado transitorio, cuando son usadas para catálisis o separación de mezclas.

Cada vez, mayor número de artículos [124-135] y patentes están dedicadas a las aplicaciones industriales de las CDs y, al menos la mitad de ellos, tratan de aplicaciones farmacéuticas. Sus muchos usos y gran disponibilidad, junto con las consideraciones económicas, juegan un papel decisivo en su creciente interés.

Cuando un fármaco entra a formar parte del complejo de inclusión, sus propiedades físicas y químicas son modificadas, normalmente, de forma ventajosa.

En términos de la estabilidad física y química, los complejos de compuestos volátiles son menos propensos a evaporarse y los compuestos oxidables son protegidos contra la oxidación del aire. En estos compuestos, las velocidades de las reacciones de descomposición, desproporción, polimerización y autocatálisis disminuyen considerablemente y su sensibilidad a la luz, los jugos gástricos, etc... se reduce.

También hay que tener en cuenta que la biodisponibilidad de las sustancias que son poco solubles en agua se mejora. En los complejos de CDs, los fármacos poco solubles en agua llegan a la sangre más rápidamente y en concentraciones más elevadas, lo que sugiere la posibilidad de reducir la dosis.

La primera patente en la preparación de complejos de drogas con CD se registró en 1953 por Freudenberg, Cramer y Plieninger [136].

I.B.2.5.- Aplicaciones analíticas

A continuación, se describen los procedimientos descritos en la bibliografía que hacen uso de ciclodextrinas para la determinación fluorimétrica de diversos analitos. Las determinaciones fosforimétricas se describen en mayor profundidad, en el apartado I.C.3.3.

La primera observación del aumento de fluorescencia que se producía cuando un analito se incluía en disoluciones acuosas de ciclodextrinas, data de 1967, cuando Cramer y col. [137] estudiaban ANS. Este hecho hizo que muchos científicos emplearan la fluorescencia como herramienta para el estudio de los mecanismos de los procesos de inclusión en disolución.

Los iones metálicos también pueden formar complejos. Así, en 1986, García Sánchez y col. [138] determinan Be (II) fluorimétricamente mediante la inclusión de su complejo fluorescente con 1-amino-4-hidroxiantraquinona en β -CD. Los autores comparan el método de determinación en ausencia y presencia de ciclodextrina. Este presenta un rango de aplicación entre 10 y 70 ng mL⁻¹ y un límite de detección de 3

ng mL⁻¹ en presencia de β -CD, más bajos que en ausencia, 60-500 ng mL⁻¹ y 17 ng mL⁻¹ respectivamente, así como menor número de interferencias.

Mediante su complejo con bencil-2-piridilcetona-2-piridilhidrazona [139], en presencia de β -CD, se ha determinado Ga (II) con un intervalo de aplicación entre 0.8 y 700 ng mL⁻¹, y límite de detección de 0.25 ng mL⁻¹. Análogamente, se ha determinado Sc (III) [140], mediante su complejo con 1,4-dihydroxiantraquinona, en presencia de β -CD, en el intervalo comprendido entre 0.5 y 400 ng mL⁻¹, presentando un límite de detección de 0.15 ng mL⁻¹. En estos dos casos no se compara con el procedimiento propuesto en ausencia de β -CD.

Zr (IV) se determina, con notable incremento de la selectividad del método, mediante la fluorescencia del complejo de inclusión de ferrón, ácido 8-hidroxi-7-iodoquinolina, con β -CD. El límite de detección es de 0.07 : g mL⁻¹ [141].

Se observó un aumento de la señal cuando se formó el complejo ternario constituido por Tb (III), ácido trimésico y β -CD cuando se añadía una sal de zirconato [142].

La fluorescencia del complejo formado por pireno: β -CD (1:2) es atenuada en presencia de iones Cu (II) en disolución. Éstos interactúan con el complejo ternario (1:2:2) formado. Cuando se añade glutamato, cuya afinidad por los iones de cobre es mayor que la de éstos por el complejo, éste presenta la misma fluorescencia que en ausencia de Cu (II) [143].

Harada y col. [144] demuestran que la señal de TNS es aumentada 25 veces con β -CD y más de 30 veces con polímeros que contienen ciclodextrinas. El aumento se debe a la restricción de la rotación intramolecular que se produce debido al microentorno rígido de la cavidad de la CD. Como consecuencia de ello, se produce una disminución de la desactivación vibracional.

Los primeros usos analíticos de las ciclodextrinas como potenciadores de la

fluorescencia fueron descritos en los años 80. La emisión de derivados de luminol, en presencia de β -CD, es dos veces superior que en su ausencia [145].

Hay que tener en cuenta que no todas las especies fluorescentes experimentan un aumento de la señal cuando se incluyen en las ciclodextrinas, puesto que deben considerarse aspectos adicionales como son las constricciones estéricas de la molécula huésped, la naturaleza y fortaleza de los enlaces establecidos entre el huésped y el anfitrión, etc... Un claro ejemplo se presenta con 5-metoxipsoraleno, el cual experimenta un aumento de la señal cuando se compleja con β -CD, mientras que su isómero, 8-metoxipsoraleno, no presenta ningún tipo de aumento [146].

La procaína es determinada, en diferentes preparaciones farmacéuticas, mediante su complejo de inclusión en β -CD, con rango dinámico lineal de 10 a 680 ng mL⁻¹ y límite de detección de 2.5 ng mL⁻¹ [147].

El pesticida warfarina (3-(4-acetonilbencil)-4-hidroxycumarina) se determina, asimismo, en presencia de β -CD [148]. El intervalo de aplicación se encuentra entre 0.2 y 4 : g mL⁻¹, y el límite de detección en 0.06 : g mL⁻¹ mientras que en ausencia de β -CD, éste es de 1 : g mL⁻¹ [149]. Este mismo analito junto con bromodiolona es determinado por Panderó y col. [150], en las mismas condiciones.

También ha sido descrito un notable incremento en la fluorescencia de retinal en disolución acuosa, en presencia de β -CD [84]. Este compuesto, que en medio acuoso no presenta fluorescencia perceptible, y cuya eficacia cuántica de fluorescencia en acetonitrilo o alcanos es de 1.0×10^{-5} , presenta en disoluciones acuosas de β -CD una eficacia cuántica próxima a 7.0×10^{-3} .

Diversas drogas alucinógenas, entre ellas, N,N-dimetiltriptamina, hemisulfato de mescalina, hidroclicloruro de ibogaina e hidrocarburo de mescalina se han investigado en presencia de β -CD [151]. Los aumentos en la emisión de fluorescencia de estos compuestos van desde 1.4 en el caso la N,N-dimetiltriptamina

a 4.0 en el caso del hidrocloreuro de ibogaina.

También se han descrito [152,153] incrementos, del orden de 2 veces, en la emisión de los tiol-derivados de 7-fluorobenzo-2-oxa-1,3-diazol-4-sulfonato amónico con glutatona, acetilcisteína y cisteína, cuando se encuentran incluidos en β -CD. En esta situación, los ácidos dansil amino: Dansil-L-alanina, ácido dansil-DL-glutámico, dansil-DL-norleucina y dansil-DL-metionina, presentan incrementos de 5 veces en la emisión de fluorescencia.

Varios hidrocarburos poliaromáticos [154] y piazselenol [155] han sido determinados en medios organizados de β -CD y surfactantes, y en presencia de otros hidrocarburos poliaromáticos, mediante su inclusión en β -CD, el acenafteno ha sido selectivamente determinado [156].

En un estudio llevado a cabo con aminocumarina [157] se demuestra que, gracias a la interacción que se produce con las CDs, es posible obtener señales de fluorescencia bastante elevadas, además de estabilizar los analitos incluidos en la cavidad de ésta.

Maafi y col. [158] estudian las propiedades fluorescentes de derivados aromáticos del norbornadieno al ser incluidos en la cavidad de la β -CD.

El aumento de fluorescencia de ANS cuando se incluye en una β -CD modificada fue estudiado por Wagner y col [159]. Éste es debido, mayoritariamente, a que la acción de los atenuadores de la fluorescencia presentes en el agua es prevenida al incluirse la molécula en la cavidad de la ciclodextrina.

Naproxén, droga empleada como antiinflamatorio, se usa en formulaciones farmacéuticas que contienen moléculas hidrofílicas que interaccionan con esta droga mejorando su solubilidad y biodisponibilidad; sin embargo, algunas de estas especies pueden afectar la fluorescencia que éste emite. En ese sentido, Vélaz y col [160] encuentran que vinilpirrolina actúa de atenuador de esta fluorescencia, mientras que

en presencia de CDs muestra un aumento [161]. El pH del medio es un aspecto muy importante a tener en cuenta, ya que son las formas ácida y neutra de la molécula las que forman complejos con HP- β -CD.

Otro ejemplo del fuerte efecto que ejerce el pH del medio en la inclusión, es estudiado para el sistema ácido salicílico-salicilato, en presencia de HP- β -CD [162].

Maafi y col [163,164] desarrollan la primera determinación espectrofluorimétrica de una droga anticancerígena derivada de la fenotiacina, en presencia de ciclodextrinas. Estudian el complejo de inclusión 2-hidroxipropil- β -CD:benzo[a]phenotiacina y obtienen un aumento en la intensidad de fluorescencia de 12 veces, respecto al analito libre.

Aunque la warfarina, usada como rodenticida o droga anti-trombo, es por sí misma fuertemente fluorescente, I shiwata y col. [165] demuestran que el empleo de β -CD hace aumentar la señal de fluorescencia del compuesto.

Los flavonoides naturales, rutín y hesperidín, presentan un grupo cromóforo similar al de la warfarina, así que al ser estudiados encuentran que rutín muestra un aumento de fluorescencia cuando se compleja con varias CDs [166-168].

Se han llevado a cabo muchos estudios de moléculas pertenecientes a la familia de los polienos. Retinol y sus derivados son de gran interés debido a sus propiedades relacionadas con las membranas celulares, la proliferación y diferenciación de las células o porque se emplean como suplemento en la dieta. Retinal (juega su papel principal en el proceso de la visión), así como sus isómeros, el ácido retinoico y el acetato de retinilo, emiten fluorescencia a temperatura ambiente cuando se incluyen en las ciclodextrinas: α -CD, β -CD, γ -CD, DM- β -CD, TM- β -CD y HP- β -CD [169,85].

En el caso en el que los analitos presentan fluorescencia nativa, la adición de CDs para formar el correspondiente complejo de inclusión se aprovecha para la

determinación de estequiometrias y constantes de asociación [170-172].

No fue hasta comienzos de los años 90 cuando los científicos comenzaron a emplear otros derivados de las CDs: Hidroxipropil- β -CD (HP- β -CD) y heptakis-*o*-dimetil- β -CD (DM- β -CD), al comprobar que todos ellos presentan una mayor solubilidad en agua que la ciclodextrina madre. De este modo, se puede emplear un exceso de reactivo favoreciendo así el proceso de complejación. En ese sentido, Vázquez y col. [173] demostraron la superioridad de DM- β -CD sobre las otras CDs empleadas para aumentar la fluorescencia de las aflatoxinas B₁ y G₁. Hesperidín, en presencia de HP- β -CD y DM- β -CD (β -CD con 1.8 grados de sustitución por grupos metilo), ve aumentada su fluorescencia en 17 y 26 veces, respectivamente, al formarse complejos 1:1 [174].

Se estudia el efecto que produce β -CD así como 4 modificaciones de ésta: urea- β -CD, hidroxietil- β -CD, 2-hidroxipropil- β -CD, heptakis (2,6-di-*o*-metil)- β -CD, en el comportamiento fluorescente de 14 dansilaminoácidos y 33 compuestos orgánicos. Se concluye que el uso de 2-hidroxipropil- β -CD, en lugar de β -CD, mejora las señales fluorescentes presentadas por la mayoría de los compuestos estudiados [175].

La determinación de tetraciclinas en orina fue llevada a cabo empleando 2,6-*o*-dietil- β -CD inmovilizada en sílica gel [176].

Maafi y col. [177] emplean fluorescencia inducida fotoquímicamente (PI F) para determinar otra fenotiacina, azure A, en presencia de β -CD, aumentando así la fluorescencia del fotoproducto en el que se transforma azure A, tras la irradiación. Esta técnica, se ha empleado para la determinación de distintos tipos de pesticidas aromáticos [178]. Los que no presentan fluorescencia nativa dan lugar a complejos fluorescentes (1:1) en disolución acuosa tras la irradiación. Los que lo son, muestran un aumento de la señal en presencia de varias CDs. Las aplicaciones realizadas empleando PI F se describen con más detalle, en el apartado I.D.

En técnicas de separación, la combinación de ambos tipos de moléculas: ciclodextrinas y micelas, proporcionan un amplio espectro de separación, en particular, para moléculas neutras, aunque las CDs sean necesarias y exclusivas para la separación de enantiómeros.

Aunque los métodos directos de análisis en los que se emplean ciclodextrinas sean preferidos por su simplicidad y rapidez, en muchos casos, la complejidad de la matriz que acompaña al analito requiere de otras técnicas de separación. En este contexto, la adición de CDs al sistema cromatográfico debe ser considerada cuidadosamente. Cepeda-Sáez y col. [179] describen el aumento producido en la señal de la droga 5-metoxipsoraleno al añadir a la fase móvil 1.0×10^{-2} M de β -CD.

Francis y col. [180] fueron los primeros en dilucidar el gran interés que supone la adición post-columna de β -CD para aumentar la fluorescencia de las aflatoxinas B_1 y G_1 .

De modo similar a los métodos directos, descritos anteriormente, se demostró que DM- β -CD era la que originaba mayores señales de fluorescencia en la determinación de B_1 y G_1 , en muestras de alimentos [181], y más recientemente, en el análisis de G_1 y su metabolito P_1 , en orina [182].

Jin y col. [183] publicaron un estudio comparativo del aumento de fluorescencia para sistemas que empleaban diferentes β -CD y mezclas de surfactantes-ciclodextrinas. El aumento de señal experimentado por sulfobutiléter: β -CD, en plasma humano, fue analizado por cromatografía de exclusión por tamaño [184]. HPLC con detección fluorescente también se ha empleado para obtener información acerca de las constantes de los analitos con las ciclodextrinas añadidas a la fase móvil. En la década de los 90, dos estudios han usado esta técnica, uno con pireno y antraceno [185] y otro con moléculas derivadas de carbazol [186].

Empleando fluorescencia inducida por láser (LIF), Smith y col [187] pusieron a punto un método con el que se separaron, por primera vez, metabolitos de

hidrocarburos aromáticos empleando β -CD y cromatografía electrocinética micelar (MEKC).

Con la misma técnica, la señal de fluorescencia de oxacina es aumentada 750 veces, en presencia de β -CD, tras la formación del complejo de inclusión [188]. Con detección fluorescente indirecta de hidrocarburos aromáticos aminosustituidos se demuestra que al adicionar una de estas especies, la señal de fluorescencia disminuye. Estos resultados están de acuerdo con el modelo de interacción propuesto entre los analitos y la oxacina.

Para la determinación de 16 hidrocarburos aromáticos contaminantes de suelos se empleó la ayuda de ciclodextrinas en la separación por electroforesis capilar, y empleando detección LIF [189,190].

En un campo de aplicación diferente, se lleva a cabo una separación de ácidos de la resina, seguida de una derivatización con ciclodextrinas modificadas, electroforesis capilar y detección LIF [191]. El procedimiento supone la reacción de 4-bromometil-7-metoxicumarina, un marcador fluorescente para el grupo carboxílico del grupo ácido de las resinas. Los ésteres formados son muy estables y excitados a 325 nm, emiten fluorescencia a 400 nm.

Recientemente, ha sido descrita la determinación fluorimétrica de rivo flavina empleando una fibra óptica [192] y Berzas-Nevado y col. [193] han comprobado que aunque la vitamina K₃, sea fluorescente una vez reducida, esta señal puede aumentar por la adición de β -CD, al formarse un complejo binario. El método puesto a punto se aplica a formulaciones farmacéuticas.

La experiencia de nuestro grupo de investigación en el estudio de las aplicaciones analíticas de ciclodextrinas es amplia [194,195]. Así, se han estudiado detalladamente la complejación de pireno en β - y α -CD [196], así como de estos complejos en presencia de una serie de alcoholes con los que se forman complejos ternarios de gran estabilidad [197,198]. Estos últimos, han sido utilizados como co-

modificadores de la fase móvil en HPLC, con disoluciones metanol:agua: β -CD [185,199,200]. Igualmente, se han estudiado las características de los complejos ternarios formados por pireno en β -CD, en presencia de tert-butilamina, n-propilamina [201] y trietanolamina [202].

Se han establecido las características de los complejos de inclusión acridina: β -CD en agua [203], en presencia de terc-butanol y ciclopentanol [204], de Triton X-100 en β -CD [205] y de dexorubicina en β -CD y α -CD [206].

Asimismo, las características luminiscentes de los complejos de inclusión formados por dos pesticidas derivados del naftaleno, ácido 1-naftilacético y 2-naftiloxiacético [207] han sido estudiadas.

La determinación fluorimétrica de ácido nalidíxico mediante complejación con α -CD [208] y de sulfametoxazol mediante inclusión en disoluciones de β -CD, en urea [209] ha sido puesta a punto, y han desarrollado estudios básicos sobre la influencia de β -CD y 2-HP- β -CD en la fotooxidación de fenotiacina [210] y azureno A [177,211].

Muñoz de la Peña y col. [212] han estudiado la fluorescencia que presenta 1,4-difenil-1,3-butadieno cuando es incluido en α -, β - y γ -ciclodextrina. Se determina la estequiometría del complejo formado con cada ciclodextrina, comprobándose el diferente comportamiento que presenta el analito en α -CD, con respecto a β -CD o γ -CD.

Las propiedades fluorescentes del ácido 7-hidroximetilnalidíxico en disoluciones acuosas de α -CD [213] han sido estudiadas, además de comprobar que el complejo que se forma presenta una estequiometría 1:1.

Recientemente, herbicidas de la familia de las fenilureas se han determinados en disolución acuosa, empleando fluorescencia inducida fotoquímicamente [214,215].

La obtención de RTP con CDs también ha sido investigada por nuestro grupo,

los resultados obtenidos se detallan en la sección I.C.3.3.

I.B.3. - Bibliografía

- [1] E. Pelizzetti, E. Pramauro, *Anal. Chim. Acta*, 169 (1985) 1
- [2] L.J. Cline Love, J.G. Habarta, J. G. Dorsey, *Anal. Chem.*, 56 A (1984) 1132
- [3] E. Pramauro, E. Pelizzetti, *Comprehensive Analytical Chemistry*, Vol: XXXI, Surfactants in Analytical Chemistry, Nueva York (1996)
- [4] J.K. Thomas, *Chem. Rev.*, 80 (1980) 283
- [5] B. Lindman, H. Wennerstrom, H. F. Eicke, "Micelles" en *Topics in Current Chemistry*, nº87, Springer-Verlag, Nueva York (1980)
- [6] J.H. Fender, "Membrane Mimetic Chemistry", Wiley, Nueva York (1982)
- [7] G. McIntire, *Crit. Reviews in Anal. Chem.*, 21 (1990) 257
- [8] F.M. Menger, *Acc. Chem. Res.*, 12 (1979) 111
- [9] J.K. Thomas, *Ibid*, 10 (1977) 133
- [10] K. Kalyanasundaram, J.K. Thomas, *J. Phys. Chem.*, 80 (1976) 1462
- [11] K.A. Dill, D.E. Kappel, R.S. Cantor, J.D. Dill, D. Bendedouch, S.H. Chen, *Nature*, 309 (1984) 42
- [12] W.L. Hinze, H.N. Singh, Y. Baba, N.G. Harvey, *Trends in Anal. Chem.*, 3 (1984) 193
- [13] W.L. Hinze, "Solution Chemistry of Surfactants", K.L. Mittal Ed. Plenum Press, Nueva York (1979)
- [14] T. Wolf, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.*, 85 (1981) 145
- [15] T. Wolf, *J. Colloid. Interface Sci.*, 83 (1981) 658
- [16] K. Kalyanasundaram, F. Grieser, J.K. Thomas, *Chem. Phys. Lett.*, 51 (1977) 501
- [17] N.J. Turro, K.C. Liu, M.F. Chow, P. Lee, *Photophys. Photobiol.*, 22 (1978) 523
- [18] L.J. Cline Love, M. Skrilec, J.G. Habarta, *Anal. Chem.*, 52 (1980) 754
- [19] M. Skrilec, L.J. Cline Love, *Ibid*, 52 (1980) 1559
- [20] L.J. Cline Love, M. Skrilec, *Ibid*, 53 (1981) 2103
- [21] L.J. Cline Love, J.G. Habarta, M. Skrilec, *Ibid*, 53 (1981) 437
- [22] M. Skrilec, L.J. Cline Love, *J. Phys. Chem.*, 85 (1981) 2047
- [23] N.J. Turro, M.J. Aikawa, *J. Am. Chem. Soc.*, 102 (1980) 4866

- [24] R. Weinberger, P. Yarmchuk, J.L. Cline Love, *Anal. Chem.*, 54 (1982) 1552
- [25] R.A. Femia, L.J. Cline Love, *Ibid*, 56 (1984) 327
- [26] I. Rapado-Martínez, R.M. Villanueva-Camanas, M.C. García-Álvarez-Coque, *Analyst*, 119 (1994) 1093
- [27] Y. Liu, I.I. García Alonso, M.R. Fernández de la Campa, M.E. Díaz García, A. Sanz-Medel, *Mikrochim. Acta*, 1 (1991) 199
- [28] Y. Liu, I.I. García Alonso, M.R. Fernández de la Campa, M.E. Díaz García, A. Sanz-Medel, *Mikrochim. Acta*, 1 (1991) 53
- [29] M.E. Díaz García, A. Sanz-Medel, *Anal. Chem.*, 58 (1986) 1436
- [30] A. Sanz-Medel, P.L. Martínez García, M.E. Díaz García, *Ibid*, 59 (1987) 774
- [31] M.R. Fernández de la Campa, M.E. Díaz García, A. Sanz-Medel, *Anal. Chim. Acta*, 212 (1988) 235
- [32] M.E. Díaz García, M. R. Fernández de la Campa, W.L. Hinze, A. Sanz-Medel, *Mikrochim. Acta*, 3 (1988) 269
- [33] Y. Liu, M.R. Fernández de la Campa, M.E. Díaz García, A. Sanz-Medel, *Anal. Chim. Acta*, 234 (1990) 233
- [34] L.D. Li, W.G. Huang, *Anal. Chim. Acta*, 312 (1995) 345
- [35] A.J. Tong, Y.G.Wu, L.D. Li, *Guangpuxue-Yu-Guangpu-Fenxi*, 18 (1998) 38
- [36] A.J. Tong, Y.G.Wu, L.D. Li, *Anal. Chim. Acta*, 322 (1996) 91
- [37] Y.S. Wei, X. Yang, W.J. Jin, S.Z. Zhang, R.L. Chen, C.S. Liu, *Fenxi-Huaxue*, 25 (1997) 1259
- [38] X.H. Bai, Y.S. Wei, C.S. Liu, *Ibid*, 25 (1997) 822
- [39] X.H. Bai, Y.S. Wei, C.S. Liu, *Fenxi-Kexue-Xuebao*, 15 (1999) 363
- [40] X.H. Bai, Y.S. Wei, C.S. Liu, *Ibid*, 27 (1999) 388
- [41] X.H. Bai, Y.S. Wei, Z.H. Qi, C.S. Liu, *Fenxi-Shiyanshi*, 18 (1999) 35
- [42] Y.S. Wei, W.J. Jin, C.S. Liu, H.P. Zhou, H.B. Tong, N.C. Zhang, *Spectrochim. Acta*, 53A (1997) 1405
- [43] J.N. Miller, *Trends in Anal. Chem.*, 1 (1981) 31
- [44] R.J. Hurtubise, *Anal. Chem.*, 55 (1983) 669
- [45] J. Weijun, L. Chansong, *Microchem. J.*, 48 (1993) 94
- [46] J. Weijun, L. Chansong, *Anal. Chem.*, 65 (1993) 863
- [47] S.C.M. Gioia, A.D. Campiglia, *Anal. Chim. Acta*, 287 (1994) 89

- [48] T. Ai-Jun, W. Yingguang, L. Longdi, *Ibid*, 271 (1996) 171
- [49] J.A. Murillo Pulgarín, A. Alañón Molina, P. Fernández López, *Ibid*, 382 (1999) 77
- [50] J.A. Murillo Pulgarín, A. Alañón Molina, P. Fernández López, *Analyst*, 122 (1997) 253
- [51] J.A. Murillo Pulgarín, A. Alañón Molina, M.T. Alañón-Pardo, *Anal. Chim. Acta*, 423 (2000) 85
- [52] A. Segura Carretero, C. Cruces Blanco, A. Fernández-Gutiérrez, *Analyst*, 122 (1997) 563
- [53] A. Segura Carretero, C. Cruces Blanco, A. Fernández-Gutiérrez, *Talanta*, 43 (1996) 1001
- [54] A. Segura Carretero, C. Cruces Blanco, B. Cañabate-Díaz, A. Fernández-Gutiérrez, *Analyst*, 123 (1998) 1069
- [55] A. Segura Carretero, C. Cruces Blanco, F. Alés Barrero, A. Fernández-Gutiérrez, *J. Agr. Food Chem.*, 46 (1998) 561
- [56] A. Segura Carretero, C. Cruces Blanco, R. Estrada Fernández, A. Fernández-Gutiérrez, *Fresenius, J. Anal. Chem.*, 360 (1998) 605
- [57] R.A. Femia, L.J. Cline Love, *Spectrochim. Acta*, 42A (1986) 1239
- [58] D.W. Armstrong, W.L. Hinze, K.H. Bui, H.N. Singh, *Anal. Lett.*, 14 (1981) 1659
- [59] P. Yarmchuk, R. Weinberger, R.F. Hirsch, L.J. Cline Love, *Anal. Chem.*, 54 (1982) 2233
- [60] M. Arunyanart, L.J. Cline Love, *Ibid*, 56 (1984) 1557
- [61] P. Yarmchuk, R. Weinberger, R.F. Hirsch, L.J. Cline Love, *J. Chromatogr.*, 47 (1984) 283
- [62] S. Panderó, A. Gómez-Hens, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chem.*, 66 (1994) 919
- [63] S. Panderó, A. Gómez-Hens, D. Pérez-Bendito, *Anal. Lett.*, 28 (1995) 1405
- [64] D. Pérez-Bendito, A. Gómez-Hens, M. Silva, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 14 (1996) 917
- [65] A. Muñoz de la Peña, A. Espinosa-Mansilla, J.A. Murillo Pulgarín, A. Alañón Molina, P. Fernández López, *Analyst*, 123 (1998) 2285
- [66] A. Muñoz de la Peña, A. Espinosa-Mansilla, J.A. Murillo Pulgarín, A. Alañón Molina, P. Fernández López, *Talanta*, 48 (1999) 1061

- [67] A. Berthod, *J. Chim. Phys.*, 80 (1983) 407
- [68] G. Ramis Ramos, I.M. Khasaweh, M.C. García-Álvarez-Coque, J.D. Winefordner, *Talanta* 35 (1988) 41
- [69] W.J. Jin, Y.S. Wei, W.S. Duan, C.S. Liu, S.S. Zhang, *Anal. Chim. Acta*, 287 (1994) 95
- [70] A. Segura Carretero, C. Cruces Blanco, A. Fernández-Gutiérrez, *Anal. Sci.*, 12 (1996) 653
- [71] J. Weijun, D. Yansheng, L. Changsong, Z. Sushe, *Anal. Chem.*, 54 (1994) 1552
- [72] C. Cruces Blanco, A. Segura Carretero, A. Fernández-Gutiérrez, *Anal. Chim. Acta*, 318 (1996) 357
- [73] A. Segura Carretero, C. Cruces Blanco, A. Fernández-Gutiérrez, *Ibid*, 329 (1996) 165
- [74] A. Segura Carretero, C. Cruces Blanco, A. Fernández-Gutiérrez, *Analyst*, 122 (1997) 925
- [75] A. Segura Carretero, C. Cruces Blanco, A. Fernández-Gutiérrez, *Anal. Chim. Acta*, 353 (1997) 337
- [76] N.J. Turro, A. Jekta, *J. Am. Chem. Soc.*, 100 (1978) 5951
- [77] R. Zana, in "Surfactants Science Series"; R. Zana Ed., New York: Marcel Dekker, Vol. 22 (1987)
- [78] M. Geiger, N.J. Turro, *Photochem. Photobiol.*, 22 (1975) 273
- [79] M. Grätzel, J.K. Thomas, *J. Am. Chem. Soc.*, 95 (1973) 6885
- [80] N.E. Schore, N.J. Turro, *Ibid*, 97 (1975) 2488
- [81] K. Muthuramu, V. Ramamurthy, *J. Photochem.*, 26 (1984) 57
- [82] M.A. Martín, B. del Castillo, D.A. Lerner, J. Esquerra, J. Álvarez-Builla, *Anal. Chim. Acta*, 205 (1988) 117
- [83] C. Cruces Blanco, A. Segura Carretero, A. Fernández-Gutiérrez, M. Román Ceba, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 13 (1995) 1019
- [84] D.A. Lerner, B. del Castillo, S.M. Botella, *Anal. Chim. Acta*, 227 (1989) 297
- [85] S. Muñoz Botella, M.A. Martín, B. del Castillo, D.A. Lerner, *J. Fluorescence*, 7 (1997) 243s.
- [86] R.J. Hurtubise, New York: VCH Publishers, (1990)

- [87] T. Vo-Dinh, "Room Temperature Phosphorimetry for chemical Analysis; New York:Wiley-Interscience, (1984)
- [88] S.G. Schulman (Ed.) "Molecular Luminescence Spectroscopy-Methods and Applications: Part 2"; New York: Wiley-Interscience (1988)
- [89] G. Ramis Ramos, M.C. García-Álvarez-Coque, A. Berthod, J.D. Winefordner, *Anal. Chim. Acta*, 208 (1988) 1
- [90] T. Imdalullah, T. Fujiwara, H. Kumamaru, *Anal. Chem.*, 65 (1993) 421
- [91] H.N. Singh, W.L. Hinze, *Anal. Lett.*, 15 (1982) 221
- [92] H.N. Singh, W.L. Hinze, *Analyst*, 107 (1982) 1073
- [93] P.M. Ritenour Hertz, L.B. McGown, *Anal. Chem.*, 64 (1992) 2920
- [94] A.G. Mwalupindi, T.T. Ndou, I.M. Warner, *Ibid*, 64 (1992) 1840
- [95] A. García Torres, A.K. Chakrabarti, E. Urena Pozo, J.M. Cano, *Anal. Chim. Acta*, 217 (1989) 363
- [96] J. Medina Escriche, M.D. Cirugeda, F.H. Hernández, *Analyst*, 108 (1983) 1386
- [97] A. Datta, D. Mandal, P. Samir Kumar, S. Das, K. Bhattacharyya, *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, 94 (1998) 3471
- [98] L.R. Lin, Y.B. Jiang, X.Z. Huang, G.Z. Chen, *Spectrosc. Lett.*, 30 (1997) 1551
- [99] W. Baeyens, B.L. Ling, U.A.T. Brinkman, S. G. Schulman, *J. Biolumin. Chemilumin.*, 4 (1989) 484
- [100] P.A. Asmus, J. W. Jorgenson, M. Novotny, *J. Chromatogr.*, 126 (1976) 317
- [101] M. Amin, K. Harrington, R. Wandruszka, *Anal. Chem.*, 65 (1993) 2346
- [102] A.G. Mwalupindi, I.M. Warner, *Anal. Chim. Acta*, 306 (1995) 49
- [103] P. Djurdjevic, M. Jelkic-Stankov, A. Laban, *Talanta*, 55 (2001) 631
- [104] A. Bautista, J.J. Aaron, M.C. Mahedero, A. Muñoz de la Peña, *Analisis*, 27 (1999) 857
- [105] A.M. García-Campaña, J.J. Aaron, J.M. Bosque-Sendra, *Talanta*, 55 (2000) 531
- [106] M.L. Bender, M. Komiyama, *Cyclodextrin Chemistry*. Springer-Verlag:New York (1978)
- [107] W. Saenger, *Inclusion compounds*. Atwood J.L., Davies J.E.D., MacNicol D.D., (eds). Academic Press: London Vol. 2, p. 232 (1984)
- [108] J. Szejtli, "Cyclodextrin Technology". Kluwer Academic Publishers, Boston (1988)

- [109] K. Uekama, *Int. J. Pharm.*, 10 (1982) 1
- [110] M. Vikmon, A. Stadler-Szoke, J. Szejtli, *J. Antibiot.*, 38 (1985) 1822
- [111] J. Szejtli "Cyclodextrins and their inclusion complexes". Akademiai Kiado, Budapest (1982)
- [112] D.W. Frank, J.E. Gray, R.N. Weaver, *Am. J. Pathol.*, 83 (1976) 367
- [113] J. Szejtli, *Pharm. Technol. Int.*, 3 (1991) 15
- [114] W. Schlenk, D.M. Sand, *J. Am. Chem. Soc.*, 83 (1961) 2312
- [115] K. Harata, H. Uedaira, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 48 (1975) 375.
- [116] D.W. Armstrong, F. Nome, L.A. Spino, T.D. Golden, *J. Am. Chem. Soc.*, 108 (1986) 1418
- [117] D. Sybilska, J. Debowski, J. Jurczak, J. Zukowski, *J. Chromatogr.*, 286 (1984) 163
- [118] E. Smolkova-Keulemansova, *J. Chromatogr.*, 251 (1982) 17
- [119] D.W. Armstrong, *Anal. Chem.*, 59 (1987) 2594
- [120] M. Komiyama, H. Hirai, *J. Am. Chem. Soc.*, 106 (1984) 174
- [121] D. French, *Adv. Carbohydr. Chem.*, 12 (1957) 189
- [122] K.H. Frömring, J. Szejtli, "Cyclodextrins in pharmacy". Kluwer Academic Publishers, The Netherlands (1994)
- [123] J. Szejtli, "Proceedings of the starch convention", Detmol (1985)
- [124] D. Duchêne, "Cyclodextrins and their industrial uses". Editions de Santé. Paris, France (1987)
- [125] D. Duchêne, "Minutes of the 5th International Symposium on Cyclodextrins". Editions de Santé. Paris, France (1990)
- [126] G. Bottoni, *Prod. Chim. Aerosol Sel.*, 25 (1984) 4
- [127] K.H. Frömring, *Pharm. Unserer Zeit.*, 2 (1973) 109
- [128] T.S. Jones, *Acta Pharm. Technol.*, 30 (1984) 263
- [129] J. Pitha, L. Szenté, J. Szejtli, "Molecular encapsulation of drugs by cyclodextrins and congeners". En: S D Bruck (ed) *Controlled drug delivery*. Vol 1. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA (1983)
- [130] J. Szejtli, *Stärke*, 29 (1977) 26
- [131] J. Szejtli, "Molecular entrapment and release properties of drugs by cyclodextrins". En: W.F. Smolen, L.A. Ball (eds). *Controlled drug bioavailability*.

Vol 3. Wiley, New York, USA (1985)

[132] J.L. Atwood, J.E.D. Davies, D.D. MacNicol, "Inclusion compounds. Physical properties and applications". Vol 3. Academic Press Inc London. United Kingdom (1984)

[133] D. Duchêne, B. Debrueres, C. Vaution, S.T.P. Pharma, 1 (1985) 37

[134] D. Duchêne, C. Vaution, F. Glomot, I bid, 1 (1985) 323

[135] D. Duchêne, D. Wouessidjewe, Pharm. Technol. Int., 2 (1990)21

[136] K. Freudenberg, F. Cramer, H. Plieninger, Ger. Pat. 895.769 (1953)

[137] F. Cramer, W. Saenger, H. Spatz, J. Am. Chem. Soc., 89 (1967) 14

[138] F. García Sánchez, M. Hernández López, A. Heredia, Anal. Chim. Acta, 187 (1986) 147

[139] F. García Sánchez, M. Hernández López, J. C. Márquez Gómez, Fresenius Z. Anal. Chem., 328 (1987) 499

[140] F. García Sánchez, M. Hernández López, J. C. Márquez Gómez, Analyst, 112 (1987) 1037

[141] F. García Sánchez, J.C. Márquez Gómez, M. Hernández López, Anal. Lett., 23 (1990) 923

[142] G. Zhao, S. Zhao, J. Gao, J. Kang, W. Yang, Talanta, 45 (1997) 303

[143] S. Santra, P. Zhang, W. Tan, Chem. Comm., (1999) 1301

[144] A. Harada, M. Furue, S. Ikehara, J. Phys. Chem., 85 (1981) 1820

[145] H. Karatani, Chem. Lett., (1986) 377

[146] J. Blais, P. Prognon, G. Mahuzier, P. Vigny, J. Photochem. Photobiol. B. Biology, 2 (1988) 455

[147] F. García Sánchez, A.L. Ramos Rubio, C. Cruces Blanco, M. Hernández López, J.C. Márquez Gómez, C. Carnero, Anal. Chim. Acta, 205 (1988) 139

[148] J.C. Márquez, M. Hernández López, F. García Sánchez, Analyst, 115 (1990) 1003.

[149] M. Corn, R. Berberich, Clin. Chem. (Winston - Salem, NC), 13 (1967) 126

[150] S. Pandero, A. Gómez-Hens, D. Pérez-Bendito, Talanta, 40 (1993) 225

[151] O. Jules, S. Scypinski, L. J. Cline Love, Anal. Chim. Acta, 169 (1985) 355

[152] W.R. Baeyens, B.L. Ling, V. Corbisier, Analyst, 115 (1990)359

- [153] W.R. Baeyens, B.L. Ling, V. Corbisier, A. Raemdonck, *Anal. Chim. Acta*, 234 (1990) 187
- [154] S. Rubio Barroso, D. López López, C. Valontillera, L. Polo Díez, *Quim. Anal.*, 10 (1991) 127
- [155] Y.X. Zheng, D.H. Lu, *Mikrochim. Acta*, 106 (1992) 3
- [156] M. Tachibana, M. Furusawa, *Analyst*, 119 (1994) 1081
- [157] M.M. Asimov, A.N. Rubinov, *J. Appl. Spectroscopy*, 62 (1995) 353
- [158] M. Maafi, J. J. Aaron, *J. Incl. Phenom. Mol. Recog. Chem.*, 30 (1998) 227
- [159] B. Wagner, P.J. Macdonald, *J. Photochem. Photobiol., A. Chem.*, 114 (1998) 151
- [160] I. Vélaz, M. Sánchez, C. Martín, M.C. Martínez-Oharriz, A. Zornoza, *Int. J. Pharmaceutics*, 153 (1997) 211
- [161] E. Junquera, E. Aicart, *International J. Pharmaceutics*, 176 (1999) 169
- [162] E. Junquera, E. Aicart, *J. Incl. Phenom. Mol. Recog. Chem.*, 29 (1997) 119
- [163] M. Maafi, M.C. Mahedero, J.J. Aaron, *Talanta*, 44 (1997) 2193
- [164] M. Maafi, J.J. Aaron, M.C. Mahedero, F. Salinas, *Appl. Spectrosc.*, 52 (1998) 91
- [165] S. Ishiwata, M. Kamiya, *Chemosphere*, 34 (1997) 783
- [166] S. Letellier, B. Maupas, J.P. Gramond, F. Guyon, P. Gareil, *Anal. Chim. Acta*, 315 (1995) 357
- [167] M. Lederer, E. Leipzig-Pagain, *Anal. Chim. Acta*, 320 (1996) 311
- [168] S.M. Shuang, J.H. Pan, S.Y. Guo, M.Y. Cai, C.S. Liu, *Anal. Lett.*, 30 (1997) 2261
- [169] S. Muñoz Botella, D.A. Lerner, B. del Castillo, M.A. Martín, *Analyst*, 121 (1996) 1557
- [170] J. Nishijo, M. Nagai, M. Yasuda, E. Ohno, Y. Ushidora, *J. Pharm. Sci.*, 84 (1995) 1420
- [171] S. Letellier, B. Maupas, J.P. Gramond, F. Guyon, P. Gareil, *Anal. Chim. Acta*, 315 (1997) 357
- [172] I. Oh, M.Y. Lee, Y.B. Lee, S.C. Shin, I. Park, *Int. J. Pharm.*, 175 (1998) 215
- [173] M.L. Vázquez, A. Cepeda, P. Prognon, G. Mahuzier, G. Blais, *J. Anal. Chim. Acta*, 225 (1991) 343
- [174] S.M. Shuang, S.Y. Guo, M.Y. Lin Li, M.Y. Cai, J.H. Pan, *Anal. Lett.*, 31 (1998) 1357

- [175] P.R. Frankewich, K.N. Thimmaiah, W.L. Hinze, *Anal. Chem.*, 63 (1991) 2924
- [176] Z. Gong, Z. Zhang, *Anal. Chim. Acta*, 351 (1997) 205
- [177] M. Maafi, B. Laassis, J.J. Aaron, M.C. Mahedero, A. Muñoz de la Peña, F. Salinas, *J. Inclus. Phenom. Mol. Recog. Chem.*, 22 (1995) 235
- [178] A. Coly, J.J. Aaron, *Anal. Chim. Acta*, 360 (1998) 129
- [179] A. Sáez-Cepeda, P. Prognon, G. Mahuzier, J. Blais, *Anal. Chim. Acta*, 211 (1998) 333
- [180] O.J.Jr. Francis, G.P. Kirchenheuter, G.M. Ware, A.S. Carman, S.S. Kuan, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 71 (1988) 725
- [181] A. Cepeda, C.M. Franco, C.A. Fente, B.I. Vázquez, J.L. Rodríguez, P. Prognon, G. Mahuzier, *J. Chromatogr.*, 721A (1996) 69
- [182] B. Vázquez, C.A. Fente, G. Mahuzier, P. Prognon, *Anal. Commun.*, 36 (1999) 5
- [183] Q. Jin, Q. Zhihong, L. Zhoushun, J. Hui, Q. Wenbin, *Microchem. J.*, 53 (1996) 361
- [184] R. Gage, R.F. Venn, M.A.J. Bayliss, A.M. Edgigton, S.J. Roffey, B. Sorrell, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 22 (2000) 773
- [185] V.C. Anigbogu, A. Muñoz de la Peña, T.T. Ndou, I.M. Warner, *Anal. Chem.*, 64 (1992) 484
- [186] J.M. You, W.J. Lao, X.J. Fan, Q.Y. Ou, X.L. Jia, *Chromatographia*, 49 (1999) 95
- [187] C.J. Smith, J. Grainger, D.G. Patterson, *J. Chromatogr.*, 803 (1998) 241
- [188] T. Kaneka, Y. Saito, T. Imasaka, *Ibid*, 831 (1999) 285
- [189] R.S. Brown, J.H.T. Szolar, A. Halasz, J. Hawari, *Anal. Chem.*, 68 (1996) 297
- [190] R.S. Brown, O.H.J. Szolar, J.H.T. Luong, *J. Incl. Phenom. Mol. Recog. Chem.*, 9 (1996) 297
- [191] J.H.T. Luong, T. Rigby, K.B. Male, P. Bouvrette, *J. Chromatogr.*, 849 (1999) 255
- [192] C.C. Wang, C.I. Li, Y. H. Lin, L.K. Chau, *Appl. Spectrosc.*, 54 (2000) 15
- [193] J.J. Berzas-Nevado, J.A. Murillo-Pulgarín, M.A. Gómez-Laguna, *Talanta*, 53 (2001) 951
- [194] A. Muñoz de la Peña, T.T. Ndou, I.M. Warner, "Spectroscopic Studies in Organized Media. An Overview", en "Advances in Multidimensional Luminiscence,

Vol. 2", Editores I.M. Warner y L.B. McGawn, JAI Press, Inc.: Greenwich, CT, USA (1993)

[195] I.M. Warner, A. Muñoz de la Peña, V. Smith, T. Ndou, J.B. Zung, G. Nelson, "Studies of cyclodextrin complexes in the presence of third components" . En "Minutes of 5th International Symposium on Cyclodextrins", Editor D. Duchêne, Editions de Santé, París (1990)

[196] A. Muñoz de la Peña, T.T. Ndou, J.B. Zung, I.M. Warner, J. Phys. Chem., 95 (1991) 3330

[197] A. Muñoz de la Peña, T.T. Ndou, J.B. Zung, K.L. Greene, D.H. Live, I.M. Warner, J. Am. Chem. Soc., 113 (1991) 1572

[198] J.B. Zung, A. Muñoz de la Peña, T.T. Ndou, I.M. Warner, J. Phys. Chem., 95 (1991) 6701

[199] A. Muñoz de la Peña, V. Anigbogu, T.T. Ndou, I.M. Warner, Anal. Chem., 6 (1991) 1018

[200] V. Anigbogu, A. Muñoz de la Peña, T.T. Ndou, I.M. Warner, J. Chromatogr., 594 (1992) 37

[201] A.Y. Will, A. Muñoz de la Peña, T.T. Ndou, I.M. Warner, Appl. Spectrosc. 47 (1993) 277

[202] A.Y. Will, A. Muñoz de la Peña, T.T. Ndou, I.M. Warner, I bid, 49 (1995) 520

[203] J.M. Schuette, T.T. Ndou, A. Muñoz de la Peña, K.L. Greene, C.K. Williamson, I.M. Warner, J. Phys. Chem. 95 (1991) 4897

[204] J.M. Schuette, T.T. Ndou, A. Muñoz de la Peña, S. Mukundan, Jr., I.M. Warner, J. Am. Chem. Soc., 115 (1993) 292

[205] V.K. Smith, T.T. Ndou, A. Muñoz de la Peña, I.M. Warner, J. Inklus. Phenom. Mol. Recog. Chem., 10 (1991) 471

[206] N. Husain, T.T. Ndou, A. Muñoz de la Peña, I. M. Warner, Appl. Spectrosc., 46 (1992) 652

[207] A. Muñoz de la Peña, F. Salinas, M.J. Gómez, M.I. Acedo, M. Sánchez-Peña, J. Inklus. Phenom. Mol. Recog. Chem., 15 (1993) 131

[208] I. Durán-Merás, A. Muñoz de la Peña, F. Salinas, I. Rodríguez Cáceres, Analyst, 119 (1994) 1215.

[209] A. Muñoz de la Peña, F. Salinas, I. Durán-Merás, M.D. Moreno, Anal. Lett., 27

(1994) 1893

[210] J.J. Aaron, B. Laassis, M.C. Mahedero, A. Muñoz de la Peña, F. Salinas, J. Inklus. Phenom. Mol. Recog. Chem., 18 (1994) 69

[211] M. Maafi, B. Laassis, J.J. Aaron, M.C. Mahedero, A. Muñoz de la Peña, F. Salinas, J. Fluorescence, 7 (1997) 25S

[212] A. Muñoz de la Peña, R. Manzano Durán (1999) Resultados no publicados

[213] I. Durán-Merás, A. Muñoz de la Peña, F. Salinas, I. Rodríguez Cáceres, Appl. Spectrosc., 51 (1997) 684

[214] M.C. Mahedero, A. Muñoz de la Peña, A. Bautista-Sánchez, J.J. Aaron, Luminescence, 15 (2000) 103

[215] M. C. Mahedero, A. Muñoz de la Peña, A. Bautista-Sánchez, J.J. Aaron, J. Inklus. Phenom. Mol. Recog. Chem., (2001) (en prensa)

I.C.- LUMINISCENCIA MOLECULAR

I.C.1.- FUNDAMENTOS

- i** Diagrama de Jablonskii
- i** El estado triplete
- i** Acoplamiento espín-orbital
- i** Variables que afectan a la fosforescencia a temperatura ambiente

I.C.2.- FOSFORESCENCIA A TEMPERATURA AMBIENTE

I.C.2.1.- Clasificación

- A.- RTP en soporte sólido
- B.- RTP en disolución
 - B.1.- Sensibilizada
 - B.2.- En medios organizados
 - B.2.1.- En disoluciones acuosas de ciclodextrinas
 - B.3.- En medios no protegidos

I.C.3.- FOSFORESCENCIA A TEMPERATURA AMBIENTE EN PRESENCIA DE CICLODEXTRINAS

- 1.C.3.1.- Requisitos para la obtención de fosforescencia a temperatura ambiente en disoluciones de ciclodextrinas
- 1.C.3.2.- Átomos pesados usados en la obtención de RTP
- 1.C.3.3.- Revisión bibliográfica

1.C.4.- BIBLIOGRAFÍA

Parte de este Sub-capítulo ha dado lugar a:

g Review: "Room Temperature Phosphorescence in Cyclodextrins. Analytical Applications", A. Muñoz de la Peña, M. C. Mahedero, A. Bautista-Sánchez, *Analisis*, 28 (2000) 26-34

g A. Muñoz de la Peña, M. C. Mahedero, A. Bautista-Sánchez, Capítulo VI: "Fosforescencia a temperatura ambiente en disoluciones de ciclodextrinas". Libro: "Fosforescencia Molecular Analítica: una aproximación práctica". Editores: S. G. Schulman, A. Fernández Gutiérrez. Editorial: Springer-Verlag Ibérica S.A. (En Prensa)

Un primer paso en toda investigación es el conocimiento de la etimología de los términos que se introducen para designar un fenómeno. En nuestro caso, los vocablos **LUMINISCENCIA**, **FOSFORESCENCIA** y **FLUORESCENCIA** designan técnicas analíticas de gran interés que son la base de la Memoria que se presenta, por lo que incluimos aquí su etimología.

Fluorescencia es un bonito ejemplo de un término cuya etimología no es tan obvia como pueda parecer, de hecho, es extraño porque a primera vista contiene la palabra "fluor", elemento que no es en absoluto fluorescente. Por contraste, la etimología de las palabras **fosforescencia** y **luminiscencia** son más evidentes, ambos términos contienen la palabra luz, del griego, **ΝΗ** y del latín, lumen, respectivamente.

Fosforescencia viene del griego, **ΝΗ**, luz, **ΝΗ**, fotón y **ΝΗ**, dar o producir. Por tanto, "fosfo" significa "el que da o produce luz". Desde la Edad Media, este término ha sido asignado a materiales que resplandecen en la oscuridad después de ser expuestos a la luz. Hay muchos ejemplos de minerales que presentan esta propiedad, siendo, quizás, el más famoso de ellos el "Bolognian phosphor", descubierto por Vincenzo Cascariolo en Bolonia en 1602. Este zapatero remendón tenía por afición la alquimia y un día, dando un paseo por la zona del Monte Palermo, recogió algunas piedras que le resultaron extrañas. Al calcinarlas con carbón, observó que éstas resplandecían después de ser expuestas a la luz. Con el tiempo se supo que las piedras contenían sulfato de bario, que al ser calcinado con carbón se transforma en sulfato de bario, fosforescente. Más tarde, se asignó el mismo nombre "fosfo" a un elemento aislado por Brandt, en 1677, porque cuando se exponía al aire, ardía y emitía vapores que resplandecían en la oscuridad.

Luminiscencia viene del latín *lumen*, luz, y en un principio fue introducida como

“luminescenz” por el físico e historiador Eilhardt Wiedemann, en 1888, para designar todos aquellos fenómenos luminosos que, en contraposición a la incandescencia, no son causados únicamente por un aumento de temperatura. Según él, la luminiscencia es luz fría mientras que la incandescencia es luz caliente.

El término **fluorescencia** fue introducido por Sir George Gabriel Stokes, físico y profesor de matemáticas en Cambridge a mediados del siglo XIX. En realidad, los primeros indicios que se tienen de la observación de fluorescencia fueron proporcionados por un físico español, Nicolás Monardes, en 1565. Descubrió un peculiar color azul que procedía de una infusión de madera llamada “lignum nephriticum”. Esta madera fue investigada más tarde por Boyle, Newton y otros científicos, pero no pudieron comprender el fenómeno que se producía.

Stokes en su primer artículo [1] llamó al fenómeno observado “reflexión dispersiva”, pero en el pie de página escribió que no le gustaba ese término y que se sentía inclinado a inventar uno nuevo. Éste fue “fluorspar” que significa mineral que contiene fluoruro cálcico, fluorita, así como el término análogo de opalescencia se deriva del nombre del mineral. Ya en su segundo artículo [2] Stokes usa definitivamente la palabra fluorescencia.

Comprendemos entonces porqué fluorescencia contiene el término “fluor” que procede de “fluorspar”. Spar era el nombre inglés que se le daba en el siglo XVII a las piedras que eran más o menos transparentes y que cristalizaban con una textura laminar [3]. Como estos materiales pueden ser fácilmente fundidos y ayudar a que otros se fundan, la palabra “fluor” [4] fue empleada a menudo para expresar fluidez. También se sabe que muchas de estas piedras son coloreadas debido a la presencia de pequeñas cantidades de impurezas que explicarían las propiedades fluorescentes,

puesto que la fluorita, por sí misma, no es fluorescente.

I.C.1.- FUNDAMENTOS

La luminiscencia molecular es una rama de la espectroscopía de emisión en la que intervienen fundamentalmente los estados electrónicos de una molécula. Se basa en la detección óptica y el análisis espectral de la luz emitida por una sustancia que sufre una transición desde un estado electrónico excitado a otro de energía más baja. La mayor parte de las moléculas orgánicas contienen un número par de electrones. En el estado fundamental, éstos rellenan los diferentes orbitales, desde los de más baja energía, por pares. Por el principio de exclusión de Pauli, dos electrones en un orbital deben tener espines opuestos y el espín total S debe ser igual a cero. Debido a esto, el estado fundamental no tiene un espín electrónico neto. Tal estado ha sido denominado como estado singlete.

La excitación de una molécula normalmente conlleva la promoción de un electrón desde uno de los orbitales ocupados más altos, a otro que previamente está desocupado y al cual se le denomina a veces "orbital virtual". Mientras que el estado fundamental es generalmente un singlete, el estado excitado puede ser un singlete o un triplete, dependiendo del estado final del espín del electrón que se ha promovido al orbital más alto. La Figura I.C.1 muestra un estado fundamental, y dos configuraciones de estados excitados.

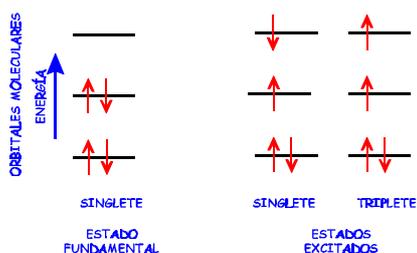


Figura I.C.1. - Diagrama esquemático de las disposiciones típicas en orbitales moleculares para los estados fundamental, singlete y triplete.

Los espines de los electrones que se encuentran en los orbitales desocupados ya no están restringidos por el principio de exclusión de Pauli. El estado singlete posee dos espines antiparalelos, mientras que el estado triplete tiene dos espines paralelos y un espín neto S de 1.

í Diagrama de Jablonskii

El diagrama de Jablonskii ilustra los mecanismos de desactivación que siguen a la excitación de una molécula a un estado excitado S_n . Los principales procesos fotoquímicos que ocurren se muestran en la Figura I.C.2.

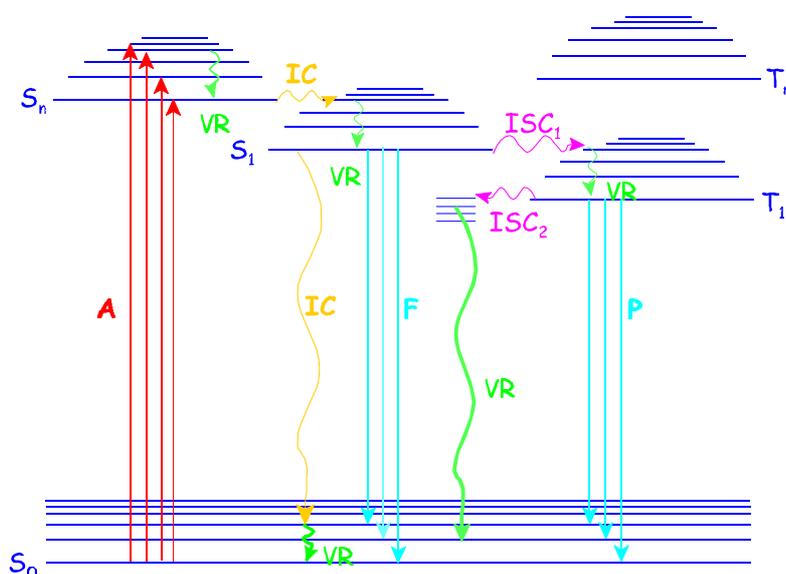


Figura I.C.2. - Diagrama de Jablonskii en el que se muestran las diferentes transiciones radiantes y no radiantes en una molécula después de su excitación a un estado singlete S_n (A, absorción; F, fluorescencia; IC, conversión interna; ISC, cruce entre sistemas; P, fosforescencia; VR, relajación vibracional).

Absorción (A)

En el equilibrio, una molécula se encuentra en el estado fundamental S_0 . Cuando absorbe energía se promueve desde S_0 a algún nivel vibracional de uno de los estados singletes excitados S_n (10^{-15} s.).

Relajación vibracional (VR)

La molécula en el estado excitado S_n se desactiva rápidamente en 10^{-13} a 10^{-11} s, mediante un proceso no radiante de relajación vibracional (VR), hasta los niveles vibracionales más bajos de los correspondientes estados electrónicos excitados. El exceso de energía vibracional se pierde en forma de energía térmica.

Conversión interna (IC)

A partir de un estado S_n , la molécula se desactiva rápidamente al nivel vibracional isoenergético de un estado electrónico más bajo, tal como S_{n-1} , mediante un proceso no radiante de conversión interna (IC). A continuación, se desactiva al nivel vibracional más bajo del estado S_{n-1} , por relajación vibracional (VR). Mediante una sucesión de procesos IC seguidos inmediatamente de procesos VR, la molécula se desactiva rápidamente al primer estado singlete excitado S_1 . Así, una molécula puede ser excitada hasta S_1 o a estados excitados de mayor energía, S_n , dependiendo de la energía de excitación que se utilice, pero la emisión solamente tiene lugar a partir del primer estado electrónico excitado (regla de Kasha).

Fluorescencia (F)

A partir de un estado S_1 , la molécula puede desactivarse a S_0 , sin emisión de radiación, mediante procesos IC y VR, o bien emitir un fotón sin cambio en la

multiplicidad del espín. Esta transición $S_1 \rightarrow S_0$ es conocida como fluorescencia (F).

Cruce entre sistemas (ISC)

Una vez en el estado S_1 , la molécula puede sufrir una transición a algún nivel vibracional del estado triplete T_1 , por un mecanismo conocido como cruce entre sistemas (ISC). Este proceso no radiante conlleva un cambio en la multiplicidad del espín. A continuación, la molécula se relaja hasta el nivel vibracional más bajo de T_1 , mediante sucesivos procesos VR.

Fosforescencia (P)

Partiendo del estado T_1 , la molécula puede volver al estado fundamental S_0 , por un proceso de desactivación no radiante (ISC₂), o por la emisión de un fotón. Esta transición radiante es conocida como fosforescencia (P).

La desactivación no radiante que compite con bastante frecuencia con la fosforescencia, es el proceso de cruzamiento entre sistemas inverso (ISC₂). Este proceso, que es frecuentemente dominante, determina el tiempo de vida de fosforescencia.

Í El estado triplete

Dado que la energía asociada a un estado con los espines paralelos es siempre más baja que la del correspondiente estado con los espines antiparalelos (regla de Hund), los estados tripletes tienen niveles de energía menores que sus correspondientes estados singletes. En consecuencia, la emisión de fosforescencia ocurre a longitudes de onda más altas que la fluorescencia.

Las propiedades de los estados singletes y tripletes son significativamente diferentes. El estado singlete es diamagnético, mientras que el triplete es paramagnético. La denominación "singlete", "triplete", proviene de consideraciones de multiplicidad del desdoblamiento de los niveles de energía cuando una molécula se expone a un campo magnético. Bajo la aplicación de un campo magnético externo, el estado triplete con su momento magnético de espín, se desdobla en tres niveles energéticos Zeeman. Por el contrario, el estado singlete, que no posee momento magnético, no sufre ningún desdoblamiento.

¡ Acoplamiento espín-orbital

Las transiciones entre diferentes estados excitados de la misma multiplicidad ($S_n \leftrightarrow S_m$ ó $T_n \leftrightarrow T_m$) ocurren con facilidad, pero las transiciones entre estados de diferente multiplicidad están prohibidas según la mecánica cuántica, por la regla de selección de espín ($\Delta S = 0$).

Sin embargo, transiciones de espín prohibido, como son las singlete-triplete, ocurren bajo ciertas condiciones. Esto es posible debido al acoplamiento espín-orbital (S-O), que consiste en el acoplamiento del espín electrónico con el momento orbital angular, fenómeno que produce una mezcla mecánico-cuántica de estados de diferentes multiplicidades. Este mecanismo puede ser explicado por el hecho de que el movimiento orbital del electrón induce un campo magnético que interactúa con el campo magnético de espín. Esta interacción produce un cambio en la dirección del momento de espín angular del electrón [5]. El acoplamiento espín-orbital, realmente induce un cierto componente de carácter singlete en los estados tripletes y viceversa. Este proceso, por tanto, hace que las transiciones entre estados singletes y tripletes dejen de ser de espín prohibido.

Í Variables que afectan a la fosforescencia a temperatura ambiente

Las principales variables que influyen sobre la señal de fosforescencia son la presencia de átomos pesados en el medio y el oxígeno disuelto.

- Efecto de átomo pesado

La presencia de especies con átomos pesados en las cercanías de una molécula puede incrementar su emisión de fosforescencia, dado que incrementan la velocidad del cruce entre sistemas (ISC). La probabilidad del proceso ISC está, a su vez, relacionada con el acoplamiento espín-orbital. Cualitativamente, este acoplamiento puede describirse como un proceso que proviene de la interacción de los campos magnéticos que resultan de los movimientos de los espines nucleares y de los espines electrónicos. Dado que la magnitud del campo magnético nuclear es directamente proporcional a la carga nuclear y, por tanto, al número atómico, el acoplamiento S-O aumenta a medida que lo hace este último. El efecto de átomo pesado produce disminución del tiempo de vida de fosforescencia y del rendimiento cuántico de fluorescencia, así como un incremento, en general, del rendimiento cuántico de fosforescencia.

Como consecuencia, la intensidad de fosforescencia se incrementa generalmente para compuestos aromáticos que tienen átomos pesados como sustituyentes. Este fenómeno se denomina "efecto de átomo pesado interno". Sin embargo, dado que este efecto puede afectar tanto a las transiciones singlete-triplete radiantes, como a las no radiantes, el aumento de fosforescencia no ocurre siempre.

La perturbación por un átomo pesado externo fue demostrada por primera vez por Kasha [6], estudiando la influencia de la presencia de yoduro de etilo en la fosforescencia de 1-cloronaftaleno. Este fenómeno de "átomo pesado externo", es diferente del "efecto de átomo pesado interno", en el cual los átomos pesados forman parte del compuesto de interés [7]. Se han propuesto varios mecanismos para explicar el efecto de átomo pesado externo en compuestos aromáticos:

g Un mecanismo de "intercambio", en el que, el estado triplete perturbado toma prestada intensidad radiante de una transición de "espín prohibido", que se localiza normalmente en el átomo pesado perturbador. La extensión de la mezcla de los estados tripletes del átomo perturbador depende del grado de interacción de intercambio entre el par de electrones del estado triplete de la molécula aromática y los electrones asociados con un estado triplete excitado del átomo perturbador [8].

g Un mecanismo de "transferencia de carga" que conlleva la interacción de los estados tripletes excitados con los estados singletes excitados de transferencia de carga, del complejo compuesto aromático-átomo pesado perturbador [9].

- Presencia de oxígeno disuelto

Uno de los más eficientes atenuadores de la fosforescencia es el oxígeno [10]. La atenuación de ésta es tan eficiente, que dicho fenómeno ha sido propuesto como método para monitorizar su difusión y la del aire en materiales tales como películas poliméricas [11]. Los principales efectos del oxígeno en el comportamiento luminiscente de los compuestos aromáticos son los siguientes:

- Disminución de la intensidad de fluorescencia.
- Disminución del tiempo de vida de fosforescencia.
- Reducción del rendimiento cuántico de fluorescencia.
- Aparición de algunas bandas de absorción debidas a complejos de transferencia de carga

- Incremento en la absorción triplete-singlete, $T_1 \rightarrow S_0$.

Hay varios modelos teóricos para explicar el efecto del oxígeno en la fosforescencia. Este efecto ha sido tratado como una interacción de intercambio intermolecular [5]. Murrell [9], describió un mecanismo por el cual el aumento en la intensidad de absorción $T_1 \rightarrow S_0$ proviene de una transición de transferencia de carga del complejo compuesto aromático- O_2 . Kawaoka y col. [12], realizaron un estudio teórico del proceso de atenuación de un estado triplete, T_1 , de una molécula, por el oxígeno, y concluyeron que el mecanismo más probable es la desactivación de la molécula desde el estado T_1 a su estado singlete fundamental, mientras que el oxígeno va desde su estado triplete fundamental a un estado singlete excitado.

Aunque el oxígeno también hace disminuir la fluorescencia, la atenuación de la fosforescencia es más drástica dado el mayor tiempo de vida del estado triplete.

El mecanismo de atenuación o "quenching" colisional puede ser descrito por la siguiente ecuación de Stern-Volmer:

$$I / I_0 = 1 + K_Q J [Q]$$

donde I e I_0 son las intensidades de luminiscencia en ausencia y presencia del atenuador Q , en una determinada concentración, respectivamente y J el tiempo de vida del estado excitado. La relación anterior muestra que para un proceso de "quenching" dado, con una velocidad K_Q , tanto J como $[Q]$ deben ser elevadas, para que la atenuación afecte a la intensidad de emisión en una extensión significativa.

Para un proceso fluorescente, en el que el tiempo de vida sea 10^{-8} segundos, la concentración de atenuador de 10^{-3} M, y una velocidad de atenuación K_Q de 10^8 moles s^{-1} , la emisión fluorescente decrece sólo un 0.1 %. El mecanismo de "quenching"

reducirá, sin embargo, la emisión de fosforescencia con un $J = 10^{-1}$ segundos en un 99.9 %.

Aunque el papel real del oxígeno continua siendo objeto de investigación, su efecto de atenuación no es crítico en sustratos sólidos, dado que pueden observarse intensas señales de RTP en presencia de aire ambiental, siempre que esté seco. Muestras líquidas, micelas, disoluciones de sensibilizadores o ciclodextrinas, sin embargo, requieren una exhaustiva desoxigenación de las disoluciones para mostrar señales de fosforescencia significativas.

I.C.2. - FOSFORESCENCIA A TEMPERATURA AMBIENTE

Los primeros antecedentes bibliográficos sobre esta técnica datan de finales del siglo XIX. En 1888, Wiedeman describió emisión de fosforescencia en disoluciones sólidas de algunos colorantes orgánicos [13]. Cuarenta y siete años más tarde, 1935, Jablonskii [14] propuso su conocido esquema de niveles de energía para explicar el fenómeno fosforescente, y Sklar [15] identificó una débil absorción singlete-singlete en el benceno. La identificación de la fosforescencia como una transición radiante entre el estado triplete más bajo y el estado singlete fundamental y la demostración de la existencia de electrones desapareados en el estado fosforescente fue hecha por Lewis y col. [16] en 1945. La existencia de un proceso de acoplamiento espín-orbital se demostró usando átomos pesados como sustituyentes [7]; asimismo, se demostró la naturaleza paramagnética de la fosforescencia [17].

A partir de estos trabajos pioneros, se han realizado numerosos estudios con objeto de comprender el fenómeno fosforescente, y se han desarrollado múltiples

aplicaciones del mismo, habiéndose convertido esta técnica en una herramienta analítica de gran utilidad.

En la década de los 60, la mayor parte de las aplicaciones fosforimétricas usaban disolventes rígidos a baja temperatura, 77 K. La necesidad de utilizar condiciones criogénicas ha sido una de las principales limitaciones de la fosforimetría a baja temperatura, Low Temperature Phosphorescence (LTP).

Un avance significativo en la generación de fosforescencia fue la introducción por Roth [18], en 1967, de la fosforescencia a temperatura ambiente, Room Temperature Phosphorescence (RTP). Esta técnica se ha convertido en un método práctico de detección de numerosos compuestos orgánicos. Papel de filtro, gel de sílice, acetato sódico y diversos compuestos inorgánicos han sido utilizados en RTP en soporte sólido [19,20].

La fosforescencia es una técnica complementaria de la fluorescencia. Así, muchos compuestos orgánicos, que tienen un rendimiento cuántico de fluorescencia bajo, debido a que sufren una eficiente desactivación por cruce entre sistemas, pueden ser detectados por fosforimetría.

Tiene además, sobre la fluorimetría, ciertas ventajas desde el punto de vista analítico. Intrínsecamente, posee una mayor selectividad, en general, que la fluorescencia, dado que no todas las moléculas que presentan fluorescencia son fosforescentes, lo que conlleva una disminución en el número de posibles interferencias en un determinado método de análisis. Por otra parte, ya hemos mencionado que la emisión de fosforescencia aparece a longitudes de onda mayores que la fluorescencia. Este hecho, se traduce en una mayor selectividad de aquella con

respecto a esta última, dado que la emisión va a aparecer en una región espectral en la que hay menos posibilidades de que se produzca emisión de posibles interferencias.

I.C.2.1.- Clasificación

A continuación exponemos los distintos procedimientos que se engloban dentro de lo que denominamos Fosforescencia a Temperatura Ambiente, y que hacen uso de diferentes medios organizados para la observación de la fosforescencia.

A) RTP EN SOPORTE SÓLIDO (SS-RTP)

Hasta comienzo de los años 70, con los trabajos de Schulman y Walling [21,22], no se reconoció el verdadero potencial de la fosforescencia a temperatura ambiente sobre soporte sólido. Desde entonces, han aparecido numerosos estudios y el fenómeno de la RTP en soporte sólido ha sido estudiado en profundidad [19,20]. El papel de filtro es la superficie sólida más usada para obtener RTP a partir de compuestos adsorbidos.

Los medios organizados han sido utilizados con objeto de incrementar las señales de fosforescencia obtenidas de sustancias fosforescentes adsorbidas en soportes sólidos. Así, el papel de filtro ha sido tratado con CDs como matriz capaz de inducir RTP en antraceno [23] y Alak y col. [24] han descrito el incremento en la señal de RTP de varios compuestos poliaromáticos y heterocíclicos, en el papel de filtro tratado con ciclodextrinas, en presencia de Tl (I) o Pb (IV) como átomos pesados. Ramasamy y Hurtubise [25] utilizaron el mismo soporte, tratado con β -CD, en presencia de NaCl o NaBr para obtener RTP en 1- y 2-naftol.

Un procedimiento diferente para incrementar la RTP en soporte sólido, es el

uso de mezclas al 80% de ^{13}C -CD/NaCl [26-31], mezclas al 1% de ^{13}C -CD/NaCl [32] y mezclas al 30% de ^{13}C -CD/NaCl [33].

La RTP en soporte sólido, sin embargo, no puede usarse en sistemas dinámicos tales como análisis por inyección en flujo o cromatografía líquida de alta resolución.

B) RTP EN DISOLUCIÓN

En bibliografía, se han descrito varios procedimientos para obtener RTP en disolución. Dichos procedimientos tienen la ventaja sobre la RTP en soporte sólido, que con ellos es teóricamente posible el desarrollo de metodologías analíticas en flujo. Dada la importancia y el auge de los métodos de análisis dinámicos, la obtención de fosforescencia en disolución, a temperatura ambiente, es un campo de investigación de gran actualidad.

B.1. - RTP sensibilizada

Hasta hace poco tiempo, RTP en disolución había sido observada solamente bajo condiciones muy especiales [34], o para un número de moléculas muy pequeño, entre las cuales el biacetilo es un ejemplo bien conocido [35]. Fueron Dokenbroek y col. [35-37], quienes demostraron el potencial analítico de la RTP sensibilizada. Un donador no fosforescente (analito de interés), transfiere la energía del estado triplete excitado a un aceptor adecuado. En condiciones ideales, esta transferencia genera un estado triplete en el aceptor con elevada probabilidad de emitir fosforescencia a temperatura ambiente.

La velocidad de transferencia de energía es proporcional a la concentración del aceptor, cuya molécula debe reunir una serie de condiciones:

- Mostrar rendimiento cuántico elevado para la fosforescencia en disolución en el disolvente de interés.

- El nivel energético del estado triplete del aceptor debe ser menor que el nivel de energía del estado triplete del donador, para que pueda ocurrir una eficaz transferencia controlada por difusión.

- La absorptividad molar del aceptor ha de ser pequeña en la región de excitación del donador.

El proceso queda resumido en la ecuación siguiente:



donde D es la molécula donadora o analito, A es la aceptor, T_1 es el estado triplete más bajo energéticamente, y S_0 es el estado fundamental.

Los estudios realizados por Dokenbroek concluyen que biacetilo puede utilizarse como molécula aceptor, con mejores resultados que otras moléculas, como puede ser 1,4-dibromonaftaleno.

La RTP sensibilizada se ha aplicado en la determinación de varios naftalenos policlorados [38], encontrándose límites de detección similares a los obtenidos en fluorescencia. También, ha sido utilizada como sistema de detección en sistemas dinámicos de flujo, FIA y cromatográficos [34,39-41], demostrándose que puede ser un sistema de detección adecuado.

La luminiscencia de los lantánidos sensibilizados es aprovechada para la determinación de teofilina por cromatografía líquida [42], donde se produce una transferencia de energía del estado triplete desde el analito al ión Tb (III), en presencia de medios micelares.

B.2. - RTP en medios organizados

Una vez resumidas las aplicaciones de MS-RTP, en la sección 1.B.1.2, describimos, a continuación, las restantes aplicaciones en medios organizados.

B.2.1.- RTP en disoluciones acuosas de ciclodextrinas (CD-RTP)

La mayoría de los métodos basados en el uso de micelas y especialmente en CD, presentan dos claros inconvenientes. El primero de ellos es que las velocidades de desoxigenación son bastante lentas puesto que el oxígeno tiene que difundir desde el interior de la micela o ciclodextrina hasta la disolución, lugar donde reacciona con el agente desoxigenante. Todo esto hace que los tiempos de análisis sean, a veces, elevados.

El otro inconveniente es que los medios micelares precipitan fácilmente con los átomos pesados, produciendo turbidez, además de formar espumas. Todo ello supone un gran inconveniente si se quiere adaptar la técnica para la detección de analitos en sistemas dinámicos como cromatografía líquida de alta resolución, HPLC, o inyección en flujo, FIA.

Estos inconvenientes han hecho pensar en la posibilidad de desarrollar nuevas metodologías en disoluciones acuosas sin necesidad de usar medios organizados. Surge entonces la RTP en medios no protegidos (NP-RTP) o RTP inducida por átomos pesados (HAI -RTP).

Los antecedentes bibliográficos de la RTP en disoluciones de ciclodextrinas serán tratadas con detalle en la sección I.C.3.

B.3.- RTP en medios no protegidos (NP-RTP)

Las siglas NP-RTP significan Non Protected Room Temperature Phosphorescence, aunque hay autores que no están de acuerdo con esta denominación y llaman a esta técnica HAI-RTP, Heavy Atom Induced Room Temperature Phosphorescence. Ambos términos coexisten en la bibliografía.

Como ya se ha visto hasta ahora, para el desarrollo de cualquier método fosforimétrico, en disolución y a temperatura ambiente, es indispensable la existencia de:

- Un medio organizado, ya sea agente micelar, microemulsión o ciclodextrina, que proporcionará la viscosidad y rigidez necesaria al microentorno que rodea al analito impidiendo la desactivación por choques intermoleculares o por atenuación.
- Un átomo pesado, externo o interno (perteneciente al propio analito) que favorezca el cruce entre sistemas.
- Un agente desoxigenante que elimine el oxígeno disuelto causante de la atenuación de la fosforescencia.

Sin embargo, se ha conseguido RTP sin el uso de medios organizados, gracias a la presencia de concentraciones elevadas de átomos pesados en las cercanías de la molécula lo que favorece considerablemente el rendimiento cuántico de fosforescencia. Hay que tener en cuenta que la magnitud del acoplamiento entre los momentos magnéticos del electrón y el momento magnético del núcleo del átomo pesado depende de la distancia entre ambos. Así por ejemplo, en los medios micelares esa distancia es bastante grande, si se compara con la distancia en la HAI-RTP, ya que viene dada por la longitud de las cadenas de los agentes micelares, que oscila entre 8 y 17 \AA , en función del agente empleado.

Para la obtención de RTP inducida por átomo pesado, la no viscosidad de los

medios produce un aumento de la constante de velocidad de desactivaciones por atenuadores, lo que implica una disminución del rendimiento cuántico de fosforescencia. Sin embargo, dada la mayor cercanía existente entre los átomos pesados y las estructuras susceptibles de proporcionar fosforescencia del analito, el acoplamiento spín orbital se ve favorecido y, en consecuencia, el rendimiento cuántico de la emisión fosforescente aumenta.

Las ventajas que presenta esta técnica frente a MS-RTP, ME-RTP (RTP en microemulsiones) o CD-RTP son las siguientes:

- Simplificación metodológica, lo que supone una mejora en los parámetros analíticos.
- Tiempos de análisis más cortos, y menores costes económicos en lo que al consumo de reactivos se refiere (no hay medios organizados).
- Desoxigenación instantánea, a concentraciones de sulfito bajas.
- Posibilidad de añadir pequeñas cantidades de disolventes orgánicos sin perturbar las características analíticas de los métodos.
- Uso de la técnica en montajes FIA y en HPLC.
- Posibilidad de trabajar a temperaturas cercanas a los 0 °C sin que existan problemas de solubilidad o precipitación de los medios organizados.

También lleva asociado algunos inconvenientes puesto que el hecho de trabajar en medio acuoso limita la aplicabilidad a compuestos que sean apolares.

El primer trabajo que se hizo en este sentido data de 1995, año en el que Li y col. [43] observaron fosforescencia en disolución acuosa de cloruro de dansilo, en presencia de TI (I) y Na_2SO_3 . Posteriormente, publican una serie de trabajos [44,45] en los que estudian la influencia que ejercen pequeñas cantidades de disolventes

orgánicos, tales como acetona, metanol, etanol y propanol, comprobando que no se producen cambios significativos en la señal de fosforescencia, aunque sí en el tiempo de aparición de dicha señal. La adición de acetonitrilo, butanona y 1,4-dioxano provoca una desaparición total de la fosforescencia.

En 1998, Segura Carretero y col. [46] publican su primer trabajo en el que consiguen obtener HAI -RTP de nafazolina, ácido β -naftoxiacético y acenafteno. Se probaron una serie de átomos pesados distintos de los normalmente empleados, Ag (I) y Tl (I), comprobando que KI proporcionaba resultados bastante buenos.

Li y col. [47] ensayan 26 compuestos derivados del naftaleno y comprueban que la mayoría de ellos emiten señales fosforescentes en presencia de Tl (I) y empleando como desoxigenante químico Na_2SO_3 . También estudian el efecto que produce en la señal de RTP de 1-bromonaftaleno, la adición de pequeñas cantidades de acetonitrilo y acetona, en disoluciones desoxigenadas con Na_2SO_3 [48].

El grupo de investigación de la Universidad de Granada aplica esta metodología a la determinación de varios compuestos en muestras reales. Así, determinan ácido β -naftoxiacético en manzanas, en presencia de Tl (I) y Na_2SO_3 [49]. En las mismas condiciones, pero sustituyendo el Tl (I) por KI, analizan nafazolina en lociones para los ojos [50] y naftalenacetamida en muestra de fruta [51]. Empleando Tl (I) determinan naproxén [52] en los medicamentos Antalgin 550 y Naprosyn Gel y más tarde, analizan el vasodilatador nafronil [53] en Praxilene, en presencia de KI.

Por otra parte, demuestran que la metodología HAI -RTP puede ser aplicada tanto a hidrocarburos aromáticos policíclicos (naftalenacetamida, naproxén, nafronil, dansilamida, carbaril y fluoreno) como a heterociclos nitrogenados (tiobendazol,

carbazol, triptamina, triptófano, 9-hidroxi-4-metoxiacridina) [54], con el solo empleo de concentraciones elevadas de átomo pesado y desoxigenando químicamente con Na_2SO_3 . Aplicando esta técnica determinan carbaril, en presencia de KI y desoxigenando químicamente [55], en muestras de agua de riego empleadas en el sur de España.

En la misma línea, Chen y col. [56] estudian la fosforescencia obtenida para ácido β -naftoxiacético, comparando los resultados obtenidos empleando como átomo pesado TI (I) o KI. Concluyen que el uso de KI hace que la señal de fosforescencia sea menor que cuando se utiliza TI (I). El mismo grupo estudia la fosforescencia de β -bromonaftaleno [57] en presencia de Na_2SO_3 , en ausencia de átomo pesado externo.

Tres derivados del ácido amino-naftalensulfónico: 1-naftilamina-4-sulfonato, 1-naftilamina-5-sulfonato y 2-naftilamina-1-sulfonato son estudiados por Mou y col. [58], en presencia de TI (I) y Na_2SO_3 . Ponen de manifiesto la importancia que tiene la posición del sustituyente en la obtención de RTP al encontrar que, en las mismas condiciones, 1-naftil-7-sulfonato y 1-naftil-8-sulfonato no emiten señal.

Se comparan las propiedades del agente luminiscente dansil-monoaza-18-crown-6 con las de cloruro de dansilo, comprobando que ambos presentan señales similares de NP-RTP, pudiendo ser empleados para el reconocimiento iónico [59].

Por último, Li y col. [60] estudian la RTP de los ácidos β - y β -naftiloxiacéticos y el efecto que produce la adición de disolventes orgánicos, aclarando la importancia que tiene la posición del sustituyente en la obtención de fosforescencia. Demuestran que se obtienen señales elevadas de ambos compuestos en medios desoxigenados y en

presencia tanto de TI (I) como de KI, como átomo pesado externo. Sin embargo, la adición de disolventes orgánicos a la disolución no sólo afecta a la RTP y al tiempo de pre-irradiación requerido para obtener una señal estable, sino que influye en la selección del átomo pesado externo. Así, se obtiene mayores señales con TI (I) que con KI.

Todos estos autores han demostrado que es posible la obtención de señales fosforescentes en disolución, a temperatura ambiente, sin emplear medios organizados pero estabilizando con átomos pesados en exceso y con la utilización de un agente desoxigenante.

Recientemente, ha aparecido un tercer grupo de investigadores interesados en el empleo de la RTP en medios no protegidos. Murillo Pulgarín y col. determinan ácido 1-naftoxiacético [61,62] (metabolito del propanolol) y naftopidil [63] en fluidos biológicos, empleando TI (I) como átomo pesado y Na_2SO_3 .

I.C.3.- FOSFORESCENCIA A TEMPERATURA AMBIENTE EN PRESENCIA DE CICLODEXTRINAS

I.C.3.1.- Requisitos para la obtención de fosforescencia a temperatura ambiente en disoluciones de ciclodextrinas

Para la observación de fosforescencia a temperatura ambiente en los diferentes medios organizados, se han de cumplir dos condiciones principales:

En primer lugar, se requiere el uso de compuestos que contengan un átomo pesado externo o interno. La presencia de éste en el entorno del compuesto

potencialmente fosforescente, incrementa en general su fosforescencia debido al aumento de la velocidad del proceso de cruce entre sistemas. Sólo para unos pocos compuestos, que no contienen átomos pesados en su estructura, tales como acenafteno, 7,8-benzoquinolina, carbazol y fenantreno, entre otros, se ha encontrado fosforescencia cuando se incluyen dentro de las ciclodextrinas, en disoluciones exentas de átomos pesados externos, pero en presencia de ciclohexano [64].

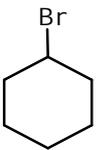
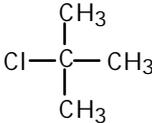
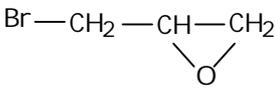
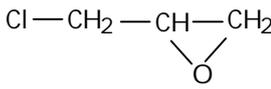
En segundo lugar, hay que tener presente que las señales de fosforescencia sólo se obtienen si se reduce la atenuación de la señal de emisión del estado triplete, debido a las pequeñas cantidades de oxígeno disuelto.

Las dos condiciones son comunes a micelas y ciclodextrinas, pero además, para obtener emisión de RTP inducida por CD, la cavidad hidrofóbica de la CD debe permitir una interacción suficiente entre el analito y el compuesto que posee el átomo pesado, como para producir una población efectiva de los estados tripletes del analito. Por su parte, luminóforo y átomo pesado necesitan estar al mismo tiempo, muy próximos, dentro de la cavidad de la CD.

I.C.3.2. - Átomos pesados usados en la obtención de RTP

Son varios los compuestos empleados como átomo pesado externo para generar RTP. En la Tabla I.C.1 se han reunido los empleados hasta la fecha.

Tabla I.C.1. - Átomos pesados usados en RTP

COMPUESTO	ESTRUCTURA
1-bromociclohexano	
2-bromoetanol	Br-CH ₂ -CH ₂ OH
3-bromo-1-propanol	Br-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ OH
Cloroformo	CHCl ₃
cloruro de t-butilo	
1,2-dibromoetano	Br-CH ₂ -CH ₂ -Br
1,2-dibromopropano	Br-CH ₂ -CHBr-CH ₃
1,3-dibromopropano	Br-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -Br
2,3-dibromopropanol	Br-CH ₂ -CHBr-CH ₂ OH
Epibromohidrina	
Epiclorohidrina	
Sales	Tl ₂ SO ₄ , TlNO ₃ , NaBr, KI

La introducción del átomo pesado externo, por adición de un compuesto orgánico, se lleva a cabo por primera vez en 1984, por Scypinski y col. [65,66]. Hasta esa fecha solamente se habían obtenido señales de RTP de compuestos que contenían en su estructura un átomo pesado. Estos autores, emplean el 1,2-dibromoetano (1,2-DBEtano) en el estudio de un amplio número de compuestos orgánicos, en la mayoría de los casos con ^2H -CD. De los compuestos propuestos es éste el más utilizado, aunque los bromoalcoholes también han sido empleados con frecuencia.

Otros compuestos utilizados, en este caso inorgánicos, han sido sales de $\text{TI}(\text{I})$, nitratos y sulfatos, ioduro de potasio y bromuro de sodio.

Sólo tenemos constancia de un trabajo en el que se usa el cloroformo como átomo pesado externo para aumentar la señal fosforescente del fenantreno [67].

Por último, en el trabajo de W. Jin y col. [64], se obtiene señal fosforescente en el estudio de algunos hidrocarburos aromáticos polinucleares (HAPs) y heterociclos nitrogenados, en presencia de ^2H -CD, al emplear ciclohexano como disolvente. No se introduce ningún átomo pesado en disolución y la señal observada se atribuye a la formación de microcristales de ^2H -CD que produce la presencia de ciclohexano.

I.C.3.3.- Revisión bibliográfica

La fosforescencia a temperatura ambiente estabilizada con ciclodextrinas es un fenómeno descrito recientemente .

En 1977, Tabushi y col. [68] emplearon una ^2H -CD modificada, con un grupo

benzofenona, para la obtención de fosforescencia de 1-bromonaftaleno.

Unos años más tarde, Turro y col. [69] observan asociaciones de tipo anfitrión-invitado cuando detergentes catiónicos fosforescentes, tales como los bromuros de (1-(4-bromonaftoil)metil) trimetilamonio (BNK-1⁺), de (5-(4-bromonaftoil)pentil) trimetilamonio (BNK-5⁺) y de (10-(4-bromonaftoil)decil) trimetilamonio (BNK-10⁺) se incluyen en β - y α -CD, mientras que tales asociaciones no se ponen de manifiesto con γ -CD.

Los mismos autores [70] encuentran que derivados halogenados del naftaleno, como 1-bromo y 1-cloronaftaleno, emiten fosforescencia en disoluciones acuosas desoxigenadas y en presencia de β -CD. En ambos casos, la adición de acetonitrilo, aumenta la señal de fosforescencia y el tiempo de vida. Asimismo, ponen de manifiesto que la atenuación originada por nitritos se reduce sustancialmente en presencia de β -CD.

Posteriormente [71], en 1983, encuentran que el grupo 4-bromo-1-naftoil, presente en cuatro compuestos distintos como son: 5-(4-bromo-1-naftoil)-1-pentanol (BNK₅A), 1-bromo-5-(4-bromo-1-naftoil)pentano (BNK₅B), p-benzoil(5-(4-bromo-1-naftoil)-1-pentil)-benzoato (BNK₅BP) y bromuro de 5-(4-bromo-1-naftoil)pentiltrimetilamonio (BNK₅N), emiten una señal de fosforescencia que decae rápidamente debido al oxígeno molecular disuelto. Sin embargo, cuando estos compuestos se incluyen en la cavidad de α -CD, la señal de fosforescencia se observa incluso bajo una presión de una atmósfera de oxígeno.

En ninguno de los trabajos antes mencionados es necesaria la presencia de átomos pesados externos porque los propios analitos ya los llevan incorporados en su

estructura. El mismo año, Cline Love y Weinberger [72] estudian las características fosforescentes de fenantreno, naftaleno, 1-fenilnaftaleno y acenafteno en presencia de $\text{\$-CD}$ y 1,2-DBEtano, en exceso, como átomo pesado. Al estudiar acenafteno se pone de manifiesto que las disoluciones aireadas presentan RTP, pero que al eliminar el oxígeno disuelto, la señal fosforescente aumenta al doble. Con ello demuestran, una vez más, que las CD son un medio óptimo para proteger el estado triplete del luminóforo de la atenuación provocada por el O_2 disuelto.

Por otra parte, en la misma publicación, también se explica el efecto de exclusión por tamaños, disolviendo dos especies fosforescentes, 1-fenilnaftaleno y naftaleno, en una disolución de $\text{\$-CD}$ a la que se añade un exceso de 1,2-DBEtano. Se observa una intensa señal de fosforescencia debido a la inclusión de la molécula más pequeña en la cavidad de la CD, no detectándose señal fosforescente para la molécula de mayor tamaño.

En 1984, Scypinski y col. [65] obtienen RTP por inclusión de HAPs en ciclodextrinas, en presencia de 1,2-DBEtano, siendo la fosforescencia parcialmente insensible a la presencia de oxígeno disuelto. Se produce un aumento de la selectividad dado que el analito debe incluirse en la cavidad de la CD y por tanto el tamaño de ésta y el del propio

analito son factores limitantes para la formación del complejo. Del grupo de HAPs estudiados, cabe resaltar que la fosforescencia de antraceno, fluoranteno, pireno y 1 y 2-bromonaftaleno, estos dos últimos sin hacer uso de átomo pesado externo, es mayor con $\text{\textcircled{C}-CD}$ que con $\text{\$-CD}$. En el caso de criseno sólo se obtiene señal con $\text{\textcircled{C}-CD}$.

Cuando los analitos en estudio son heterociclos nitrogenados de dos o tres

anillos o contienen puentes bifenilos [66] la señal de RTP observada es debida a la formación de un complejo ternario, luminóforo: β -CD:1,2-DBEtano. La señal es parcialmente insensible al oxígeno disuelto, de forma que compuestos como isoquinoleína y fenacina, en presencia de oxígeno, aún presentan más de un 10 % de la señal obtenida en disoluciones desoxigenadas. En el caso de la acridina, la presencia de oxígeno anula prácticamente por completo la señal. Los otros compuestos estudiados, bifenilos y derivados, presentan señales más débiles.

El mismo equipo de investigadores, [73] llevan a cabo estudios adicionales en disoluciones desoxigenadas por paso de N_2 y en presencia de 1,2-DBEtano como átomo pesado externo. Al emplear ^{13}C -y β -CD, de nuevo observan una selectividad en base al tamaño del luminóforo y de la cavidad de la CD que hace que sólo los analitos incluidos en la CD, al menos parcialmente, presenten fosforescencia. Así, naproxén presenta una intensa emisión al incluirse en β -CD, mientras que no fosforesce en ^{13}C -CD. De otra parte, la hidrofobicidad del compuesto incluido establece la intensidad de la señal fosforescente, presentando las señales más débiles los más hidrofílicos. Naproxén, especie relativamente no polar, presenta mayores señales en medios micelares que en presencia de β -CD como consecuencia de la débil inclusión en la CD.

En 1985, Femia y Cline Love [74] estudian la influencia del átomo pesado en la señal fosforescente de algunos HAPs tales como acenafteno, dibenzofurano, dibenzotiofeno, fenantreno, fluoreno, naftaleno, o pireno en presencia de heptakis (6-bromo 6-desoxi- β -CD). El hecho de situar el átomo pesado en una posición señalada, dentro de la molécula de ciclodextrina, hace que la fosforescencia observada y las interacciones dinámicas dependan, principalmente, de las constantes de velocidad de entrada y salida del luminóforo en la cavidad de la CD. Se pone de manifiesto que el efecto de átomo pesado es capaz de ejercer su influencia, tanto a

través de la unión del bromo al esqueleto de carbonos de la CD complejada con el luminóforo, como por medio de la más estrecha aproximación del luminóforo al extremo bromosustituido de la CD.

Los mismos autores [75], empleando barrido sincrónico, comparan la fosforescencia de hidrocarburos aromáticos polinucleares en medios micelares y en presencia de β -CD, en soluciones desoxigenadas, con TI (I) y 1,2-DBEtano como átomos pesados externos. En ambos casos, emplean la segunda derivada del espectro sincrónico para aumentar la resolución espectral. Ponen de manifiesto la aparición de turbidez debida al complejo β -CD:1,2-DBEtano, que puede reducirse disminuyendo la concentración de este alcano, con la consiguiente disminución de la intensidad de la señal. Asimismo, concluyen que para el análisis de mezclas, el medio micelar es superior a la utilización de CD. Así, en el caso de la mezcla de propanolol y su metabolito 4-hidroxi, la mezcla puede resolverse en medio micelar mientras que en presencia de β -CD no presentan fosforescencia.

Casal y col. [76] comprueban la RTP que presentan los complejos de inclusión de β -arilpropiofenonas con CD una vez liofilizadas las disoluciones desoxigenadas.

Para la obtención de fosforescencia en medio micelar, una alternativa a la desoxigenación por paso de nitrógeno es el uso de Na_2SO_3 , propuesto por Díaz García y Sanz-Medel [77]. Los ensayos realizados con 1-bromonaftaleno en presencia de β -CD pusieron de manifiesto un aumento de la señal de más de tres veces, al emplear la desoxigenación química.

En 1988, Zhang y col. ponen a punto la determinación del ácido 1-naftilacético con β -CD, en presencia de 1,2-DBEtano [78] y 1,2-dibromopropano (1,2-DBPropano)

[79] como átomos pesados. En ambos casos las disoluciones son desoxigenadas por paso de N_2 , encontrando linealidad hasta concentraciones 10^{-5} M de ácido.

Una enzima sintética [80], metil-azaparaciclofano (Metil-APC), es propuesta como molécula anfitrión en mezclas con medio micelar de SDS, para inducir señal para la determinación de 2-bromonaftaleno y TNS. Como átomo pesado se emplea TI (I) o NaBr y la desoxigenación se lleva a cabo con Na_2SO_3 . Cuando comparan la emisión de fosforescencia obtenidas con Metil-ACP y β -CD, en presencia de SDS, los autores muestran que las señales son más intensas que las obtenidas con β -CD.

Otra mezcla de medios organizados ha sido la de SDS y CD para la obtención de RTP de fenantreno [81]. Se estudia el efecto de disoluciones micelares de SDS:TI (I) (70:30) sobre la señal del complejo fenantreno: β -CD y se compara con la obtenida en presencia de 1,2-DBEtano. Por primera vez, se pone de manifiesto el efecto positivo que supone el empleo de pequeñas cantidades de surfactante que se sitúan en los extremos abiertos del toroide de la ciclodextrina reduciendo al máximo el contacto entre el fenantreno y el agua.

En los años 89 a 91, varios autores estudian el complejo acenafteno- β -CD. Así, Hamai [82] haciendo uso de 2-bromoetanol (2-BEtanol) y 2,3-dibromopropanol (2,3-DBPropanol), como átomos pesados, en disoluciones desoxigenadas con N_2 , observa señal de RTP debida al complejo acenafteno: β -CD:2-BEtanol.

En 1991, Muñoz de la Peña y col. [83] estudian el mismo complejo empleando Na_2SO_3 para la desoxigenación, de modo similar al procedimiento usado por Díaz García para la obtención de RTP en medios micelares, y determinan la constante de formación del complejo.

El mismo año, Shuang y col. comparan la señal RTP del complejo acenafteno: $\text{\$}$ -CD en presencia de epibromohidrina como átomo pesado [84] frente a la obtenida al emplear 1,2-DBPropano.

El estudio del complejo 2-bromonaftaleno: $\text{\$}$ -CD, empleando KI o TI (I), y desoxigenación química con Na_2SO_3 , llevado a cabo por Wei y col. [85], permite la determinación fosforimétrica de 2-bromonaftaleno con igual eficacia y rapidez que si se emplean como átomos pesados haluros de alcano y se desoxigena por paso de N_2 . Los mismos autores, [86] comprueban la posibilidad de determinar 7-metilquinolina con $\text{\$}$ -CD, en presencia de bromociclohexano, sin desoxigenar, con un rango de linealidad y desviación similar a la encontrada al emplear 1,2-DBPropano y desoxigenando con N_2 .

Por otra parte, la adición de diferentes alcoholes, excepto ciclohexanol, a disoluciones acuosas conteniendo 1-bromonaftaleno (1-BrN) y glucosil- $\text{\$}$ -CD, produce una intensa señal de RTP [87]. Con todos se produce un aumento de la constante de formación de los complejos formados con relación a los valores de éstas en ausencia de alcohol.

En 1993, Muñoz de la Peña y col. [88] observan la fosforescencia de pesticidas derivados del naftaleno, como los ácidos 2-naftiloxicético y 1-naftilacético, en presencia de $\text{\$}$ -CD usando como átomos pesados externos dos haloalcoholes, 2,3-DBPropanol y 2-BEtol, desoxigenando con Na_2SO_3 .

Jin y col. [64] observan RTP en algunos HAPs y heterociclos nitrogenados incluidos en $\text{\$}$ -CD, en soluciones desaireadas por paso de N_2 . Al emplear un exceso

de ciclohexano o en presencia de 1,2-DBEtano se observa la aparición de una turbidez responsable de la emisión de RTP, cuya formación se favorece agitando durante un minuto y medio.

La señal RTP del complejo 6-bromo-2-naftol (BN) en presencia de β -CD, sin eliminar oxígeno de la solución, es estudiada por Hamai [89]. Comprueba que la señal es debida al complejo 1:2 (BN: β -CD) [90] dado que el correspondiente complejo 1:1 no presenta fosforescencia. La influencia de diferentes factores en la emisión fosforescente de dicho sistema también es estudiada por Muñoz de la Peña y col. [91]. Aunque la señal de RTP se observa en disoluciones sin desoxigenar, la emisión es alrededor de 13 veces más intensa cuando se elimina el oxígeno disuelto mediante paso de N_2 . Asimismo, la emisión se incrementa al irradiar las disoluciones y la presencia de alcoholes o bromoalcoholes como tercer componente del sistema produce menor emisión que en ausencia de los mismos. El empleo de Na_2SO_3 atenúa la RTP del sistema.

La RTP de 2-cloronaftaleno incluido en 6-deoxi-6-iodo- β -CD (β -CDI) en disolución acuosa es estudiada por Hamai [92], en 1995. Aunque la ciclodextrina sin modificar también induce fosforescencia en el compuesto, el aumento de la señal producido por la (β -CDI) es mucho mayor debido a la perturbación provocada por el átomo pesado que aporta la ciclodextrina.

Chen y col. [93] realizan estudios preliminares acerca de las propiedades luminiscentes del bromociclohexano en presencia de β -CD empleando etanol, metanol o tetraclorometano. No es necesaria la eliminación del oxígeno y la presencia de turbidez parece ser responsable de la fosforescencia a temperatura ambiente.

En 1996, Zhang y col. [94] proponen dos nuevas formas de eliminar el O_2 disuelto, para la determinación de 1-cloronaftaleno empleando β -CD. Para ello, generan H_2 producido mediante la reacción $Zn[s]/HCl$, o bien CO_2 al reaccionar Na_2CO_3/HCl . Los resultados obtenidos fueron comparados con los conseguidos por la forma habitual de desoxigenar, paso de N_2 y empleo de Na_2SO_3 .

Gao y col. [95] estudian la fosforescencia de una serie de hidrocarburos aromáticos tales como acenafteno, 7,8-benzoquinolina, fenantreno y fluoreno, empleando β -CD y como átomo pesado 1,2-DBEtano. Adicionan Na_2SO_3 como agente desoxigenante comparando estos resultados con los conseguidos al utilizar paso de N_2 .

Sin ser necesaria la eliminación del oxígeno disuelto, Du y col. [96] encuentran que en disoluciones aireadas de β -CD se observa una intensa RTP debido a la formación del complejo de inclusión de 1-BrN y Triton X-100 (surfactante no iónico) en la cavidad de la ciclodextrina. La presencia de etanol produce un aumento de la señal, en cambio 1-propanol o 1-butanol atenúan la fosforescencia al reemplazar a 1-BrN del interior de la CD. El Triton X-100 es considerado como un alcohol, de acuerdo con su estructura y se añade en pequeñas cantidades para que se incluya en la cavidad de la ciclodextrina aportando la rigidez necesaria. En cuanto se alcanza la c.m.c., se forman agregados micelares que hacen que el analito pase del interior de la CD al entorno micelar.

En presencia de pequeñas cantidades de ciclohexano, Xie y col. [97] observan que la β -CD induce a 1-BrN a emitir una fuerte señal de RTP. Estudian la formación del complejo ternario y discuten cómo influye este cicloalcano en la fosforescencia del compuesto en estudio.

Du y col. [98] investigan la RTP obtenida al formarse un complejo de inclusión de β -CD:1-BrN, estabilizado por naftaleno (N) y 1-butanol (B). Se confirma que naftaleno y 1-butanol son incorporados al interior de la cavidad de la ciclodextrina como segundo y tercer huésped, haciendo así más efectiva la protección del luminóforo de los atenuadores que existen en disolución. De esta forma se consigue una gran rigidez, lo que supone un aumento de la señal fosforescente en comparación con el complejo ternario β -CD:1-BrN:B.

Como ya se ha mencionado, la única referencia del empleo de cloroformo, como átomo pesado externo, es debida a Nazarov y col. [67] que estudian la fosforescencia de fenantreno empleando disoluciones de β -CD.

En 1997, Du y col. [99] emplean una disolución de dodecilsulfonato sódico (SDBS), de concentración inferior a la concentración micelar crítica, que contiene 1-BrN, la cual mezclan con β -CD. Comprueban que en disoluciones aireadas presenta una intensa señal debida a la formación del complejo ternario β -CD:1-BrN:SDBS. Estudios espectrales y análisis estructurales de las moléculas indican que el anillo de benceno del surfactante se incluye en la cavidad apolar de la ciclodextrina, y el grupo polar, así como una parte de la cadena hidrocarbonada, se sitúa fuera de la cavidad. Se discute la influencia que tiene el SDBS y la β -CD en la obtención de RTP.

Los métodos de eliminación de oxígeno, paso de N_2 o desoxigenación química por medio de Na_2SO_3 , se comparan con los propuestos por Zhang y col. [100], que ya fue utilizado anteriormente en la determinación de 1-cloronaftaleno [94]. En este caso, estudian fenantreno empleando β -CD y 1-bromociclohexano como átomo pesado externo. Concluyen que la generación de H_2 y CO_2 son métodos desoxigenantes fáciles

de emplear, rápidos, de 1 a 2 min, no necesitan equipamientos suplementarios complicados, tienen una considerable condición ácida, que es suplementario de la desoxigenación por Na_2SO_3 , la señal de RTP es estable durante 10 min y presentan buenas características analíticas.

La RTP de 1-BrN inducida por la adición de alcoholes alifáticos (se ensaya desde etanol hasta n-octanol) en disoluciones aireadas de β -CD es estudiada por Du y col. [101] La fosforescencia aumenta a medida que lo hace el número de carbonos del alcohol, consiguiéndose la máxima señal con n-pentanol. La intensidad disminuye para alcoholes superiores.

Zhao y col. [102] comparan los efectos producidos por distintos alcoholes y CDs. Los resultados ponen de manifiesto que el enlace que se establece entre el alcohol y el anillo de la CD es a través del enlace de hidrógeno entre los grupos hidroxil del alcohol de la CD. Por otra parte, las cadenas alifáticas del alcohol cubren la parte superior e inferior de la cavidad de la CD, protegiendo al luminóforo del oxígeno y la RTP de la atenuación. Deciden denominar a este tipo de sistemas con el nombre de RTP de un agregado supramolecular (SM-RTP), haciendo notar que el sistema β -CD:1-BrN:t-butanol ofrece una intensa señal de fosforescencia sin necesidad de desoxigenación. Muñoz de la peña y col. [103] también estudian la influencia de distintos factores sobre la RTP del sistema anterior, proponiendo un método de determinación de 1-BrN entre 2.9 y 14.5 : g.mL⁻¹.

Las disoluciones de CD y de micelas se usan extensamente como medio para la obtención de RTP, pero son escasas las referencias que se tienen en las que se estudien mezclados. Du y col. son los que más han estudiado estas mezclas de medios organizados. Así, Xie y col. [104] emplean una serie de surfactantes tales como SDS,

CTAB, CTAC, Triton X-100 y Tween 20 para estudiar la fosforescencia de 1-BrN, en soluciones de β -CD sin eliminar el O_2 disuelto. Se observan intensas señales fosforescentes para el caso de los surfactantes no iónicos y el aniónico. En cambio, para CTAC y CTAB, surfactantes catiónicos, la señal obtenida es bastante débil.

Du y col. [105] determinan 1-BrN en disoluciones aireadas de β -CD. Se estudia con detalle el efecto que producen en la RTP los surfactantes mezclados con disoluciones de CD. La inclusión parcial y la estructura en espiral de la cadena hidrocarbonada del surfactante a la entrada de la cavidad de la CD es la responsable de la RTP. También comprueban que todos los surfactantes provocan RTP de 1-BrN, en disoluciones acuosas de β -CD, sin que sea necesaria la desoxigenación. Ello sugiere que la presencia de surfactantes mejora enormemente el entorno que envuelve al luminóforo y proporciona una protección efectiva para que se dé la fosforescencia. El que no se observe RTP cuando se emplean estos medios por separado se atribuye a la formación de un complejo ternario entre la CD, el analito y el surfactante. Asimismo, emplean p-t-octilpolietilenglicol-fenil-éter para determinar 1-BrN en disoluciones acuosas de β -CD [106].

La formación en disoluciones acuosas de β -CD de complejos de inclusión 1:1 con 2-cloronaftaleno (2-CIN) y a partir de éstos, obtención de los complejos 2:1, es estudiada por Hamai [107]. Al emplear disoluciones acuosas de D-glucosa, se encuentran los mismos resultados. Cuando se añade KI a las disoluciones, la intensidad de fosforescencia se incrementa inicialmente, pero disminuye al aumentar la concentración de la sal. Este aumento inicial se debe a la formación de un complejo β -CD:2CIN:I y la disminución parece ser debida a la formación de un complejo ternario de inclusión que contiene 2 iones yoduro.

El mismo autor, en 1998, [108] emplea una β -CD modificada, que ya lleva el átomo pesado incorporado (6-deoxi-6-iodo- β -CD), para estudiar la fosforescencia presentada por 6-bromo-2-naftol y 3-bromoquinolina cuando forman sus correspondientes complejos de inclusión. Se comprueba que el complejo 1:1 no presenta señal fosforescente, en cambio, cuando son dos las moléculas de CD que entran en juego, se observa RTP, siendo ésta inferior a la que se obtiene con la ciclodextrina sin modificar.

Carretero y col. [109] ponen a punto un método de optimización multivariante usando un diseño de matriz central compuesto, para optimizar la RTP del complejo ternario formado entre acenafteno: β -CD:bromoalcohol. Ensayan los alcoholes 2-BEtol y 2,3-DBPropanol con objeto de provocar un aumento en la rigidez del sistema, encontrando los mejores resultados con el último. El mismo estudio, pero empleando α -CD, lo realizan Escánder y Muñoz de la Peña [110] llegando a los mismos resultados.

Una intensa RTP inducida por surfactantes aniónicos, sin necesidad de eliminar el aire de las disoluciones, es observada por Du y col. [111] con 1-BrN. El análisis de las estructuras espectrales y la tensión superficial de las soluciones, sugieren que la cadena hidrocarbonada hidrofóbica del surfactante es parcialmente incluida en la cavidad apolar de la CD. El extremo polar de la cadena se sitúa fuera de la cavidad proporcionando una efectiva protección de los atenuadores y aumentando así la señal de RTP. El hecho de que el surfactante contenga un grupo polar hace que, una vez formado el precipitado, se disperse de forma homogénea en toda la disolución, obteniéndose señales estables.

Zhu y col. [112] comprueban que β -CD puede inducir a 4-etil-4'-iodo-(1,1'-

bifenilo) (I EBP) a emitir RTP en presencia de bromociclohexano (BCH). El empleo de butanol como cuarto componente se traduce en un evidente aumento de la señal. Investigan el efecto que producen en la fosforescencia el empleo de distintos alcoholes, ciclodextrinas y derivados de β -CD. Los resultados muestran que se forma un complejo ternario de inclusión β -CD:I EBP:BCH, en el que la misión del alcohol es actuar a modo de tapadera, considerando a la ciclodextrina como si fuese una taza, y además proteger al analito del efecto de atenuación que produce el O_2 . Por un lado, el grupo hidroxilo del alcohol se enlaza al borde de la CD mediante interacciones por puente de hidrógeno y, por otra parte, el grupo alquilo del alcohol la rodea haciendo de tapadera por ambos lados a través de fuerzas de interacción hidrofóbicas.

El efecto que produce la adición de moléculas orgánicas tales como metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol, etilenglicol, acetonitrilo, acetona y 2-butanona en la RTP de dos complejos ternarios de β -CD:analito:1,2-DBEtano es investigado por Zhang [113]. Los analitos en estudio son 1 y 2-naftol y se elimina el oxígeno disuelto por paso de N_2 .

Empleando β -CD, 1,2-DBEtano como átomo pesado externo y adicionando Na_2SO_3 para llevar a cabo la desoxigenación, Wang y col. [114] determinan quinolina.

Bai y col. [115] realizan un estudio de una mezcla de siete hidrocarburos aromáticos policíclicos, tales como acenafteno, 7,8-benzoquinolina, 1 y 2-bromonaftaleno, fenantreno, fluoreno y metilquinolina empleando como átomo pesado la epibromohidrina y en presencia de β -CD. Emplean Na_2SO_3 como desoxigenante químico.

4-Bromobifenilo se puede determinar en una disolución compuesta por β -CD

y acetonitrilo, para mejorar la solubilización. Ésta es expuesta a la luz natural durante una hora con el fin de obtener disoluciones transparentes que puedan ser medidas fosforimétricamente. También se comprueba una menor efectividad del método al emplear otras ciclodextrinas tales como α -, β - y metil- β -CD [116].

La aplicación de desoxigenación química para la determinación de acenafteno, fluoreno, fenantreno y 7,8-benzoquinolina en disoluciones de β -CD, empleando como perturbador 2-BEtolol es propuesta por Gao y col. [117].

Al mismo tiempo, Hamai [118] estudia el comportamiento luminiscente del naftaleno en disoluciones acuosas de D-glucosa, al igual que hiciera con 2-cloronaftaleno [107], pero empleando 6-deoxi-6-iodo- β -ciclodextrina en lugar de α -CD.

La determinación de fluoreno en agua de mar es llevada a cabo por Algarra-González y col. [119], empleando β -CD y como átomos pesados externos 1-propanol y 3-bromo-1-propanol. La desoxigenación es realizada mediante la adición de Na_2SO_3 .

Quinolina es determinada por Chen [120] sin necesidad de desoxigenar las disoluciones de β -CD. Como átomo perturbador usa 1,2-DBPropano, agitando las disoluciones resultantes 1 minuto para favorecer la formación del complejo de inclusión y efectuando la medida una vez transcurridos 40 minutos.

En 1999, Muñoz de la Peña y col. estudian el complejo de inclusión formado entre NAAM: β -CD:1,3-dibromopropano (1,3-DBPropano). Comprueban que la señal obtenida es mayor en presencia de bromoalcanos que en bromoalcoholes. La

desoxigenación se efectúa por paso de N_2 , por adición de Na_2SO_3 o por combinación de ambos, encontrando que es este último método el que conduce a mejores resultados. El exceso de bromoalcano origina turbidez en el medio que en parte es la responsable de la intensificación de la RTP al aportar la rigidez necesaria para la estabilización del estado triplete [121].

El efecto que producen ciertas aminas, usadas como átomos pesados externos, en la obtención de RTP de 1-bromonaftaleno en disoluciones de β -CD es estudiado por Chen y col. [122], comprobando que la t-butilamina actúa como regulador molecular y es necesario optimizar la cantidad añadida.

Bai y col. [123] realizan un estudio comparado de la señal de RTP que presenta 1 y 2-BrN cuando se emplea como átomo pesado epibromohidrina o bien epiclorohidrina, en disoluciones de β -CD. Observan que el mayor aumento de fosforescencia se produce en presencia de epibromohidrina, siendo el complejo 1-BrN: β -CD:epibromohidrina más estable que el que se obtiene con 2-BrN. Por su parte, Mou y col. [124] emplean disoluciones de β -CD, así como 1,2-DBPropano, para determinar 2-bromometilnaftaleno.

Los hidrocarburos fenantreno, 7,8-benzoquinolina y 2-bromonaftaleno [125] son estudiados empleando disoluciones de β -CD y cloruro de t-butilo como átomo pesado. Se comparan las señales con las obtenidas cuando se añade t-butanol.

En un reciente review, Muñoz de la Peña y col. [126] recogen las aplicaciones analíticas de la ciclodextrinas en la obtención de fosforescencia a temperatura ambiente.

Los mismos autores, al igual que hicieron con NAAM, llevan a cabo otro trabajo en el que se estudia el complejo de inclusión formado por NAA: β -CD:1,3-DBPropano [127]. Se comprueba, nuevamente, que la RTP es mayor en presencia de bromoalcanos que cuando se emplean bromoalcoholes. También se hace una simulación por ordenador para visualizar la disposición que presenta el analito y el átomo pesado en la cavidad de la ciclodextrina.

Para la determinación del ácido 2-naftiloxiacético [128] se emplea KI como átomo pesado externo, estudiando el efecto que produce variaciones en la concentración de éste en el tiempo de vida de la fosforescencia.

Escánder y col. [129] estudian la RTP que presenta 1-BrN cuando se incluye en β -CD. El tercer componente puede ser un alcohol (ciclohexanol, ciclopentanol y 1-pentanol) o bien, un surfactante (Triton X-100 y SDS). Además, se determinan las estequiometrias de los complejos formados con cada uno de ellos y las constantes de los equilibrios.

Por último, se determina la constante de formación del complejo 6-bromo-2-naftol: β -CD induciendo RTP mediante la adición de líquidos apolares como tercer componente [130]. Se observa un aumento de la señal con ciclohexano, encontrando, además, que los microcristales formados parecen ser necesarios para la obtención de señal.

Cabe señalar aquí que de las tres ciclodextrinas, la β -CD es la más empleada, con notable diferencia. El volumen de su cavidad, 346 \AA^3 , es adecuado para la inclusión de la mayor parte de los analitos estudiados.

Por el contrario, se observa que la β -CD tan sólo se ha empleado con cinco compuestos: 6-bromo-2-naftol, que necesita dos de estas moléculas para la formación del complejo; bromuro de (5-(4-bromo-1-naftoil)alquil)trimetilamonio, que no presenta fosforescencia; 2-cloronaftaleno, en disolución acuosa de D-glucosa; β -fenilpropiofenona y su derivado β -(2-R)-fenilpropiofenona. Se efectúa una modificación en dicha ciclodextrina, convirtiéndola en 6-deoxi-6-iodo- β -CD y utilizándola para estudiar el complejo formado con 3-bromoquinolina y 6-bromo-2-naftol. Para este último, también son necesarias dos moléculas de CD modificada para la formación del complejo.

Esta misma modificación se le realiza a β -CD, con la que se estudia la fosforescencia presentada por 2-cloronaftaleno. Además, también se utiliza la heptakis (6-bromo-6-deoxi- β -CD) que sólo se ha empleado con siete de los compuestos.

En cuanto a la γ -CD, con una cavidad de 510 \AA^3 , se emplea para los compuestos más voluminosos tales como sales de amonio cuaternario, criseno y pireno entre otros. Aunque también se ha utilizado en el caso de acenafteno y 4-bromobifenilo.

La eliminación de oxígeno de las disoluciones se lleva a cabo, en la mayoría de las aplicaciones, pasando N_2 , aunque en algunas, el complejo formado es parcialmente insensible a la presencia de oxígeno e incluso se observa emisión de fosforescencia en su presencia. Este hecho se hace mucho más evidente cuando se emplean surfactantes. La adición de éstos, ya sean aniónicos (SDS, SDBS), catiónicos (CTAC, CTAB, CTP) o, incluso, no iónicos (Triton X-100, Tween 20), hace que no sea necesaria la eliminación del oxígeno disuelto.

La otra vía clásica de desoxigenación es la adición de Na_2SO_3 que se ha empleado fundamentalmente con derivados del naftaleno. También se proponen dos nuevas formas de eliminar oxígeno mediante la generación de H_2 producido al reaccionar $\text{Zn}_{[s]} / \text{HCl}$ o bien, generando CO_2 , al hacer reaccionar $\text{Na}_2\text{CO}_3 / \text{HCl}$.

Por último, señalar que en un gran número de los compuestos estudiados, la formación del complejo conlleva la aparición de turbidez y que en algunos de ellos se lleva a cabo un barrido sincrónico.

I.C.4. - Bibliografía

- [1] G.G. Stockes, Phil. Trans., 142 (1852) 463
- [2] G.G. Stockes, Phil. Trans., 143 (1853) 385
- [3] P.J. Marquer, Dictionaire de Chymie, p. 462 (1779)
- [4] P.J. Marquer, Dictionaire de Chymie, p. 464 (1779)
- [5] S. P. McGlynn, T. Azumi, M. Kinoshita, "Molecular Spectroscopy of the Triplet State"; Prentice-Hall, Englewood Cliffs: N.J. (1969)
- [6] M. Kasha, J. Chem. Phys., 20 (1952) 71
- [7] D. McClure, I bid, 17 (1949) 905
- [8] G.W. Robinson, I bid, 46 (1967) 572
- [9] J.N. Murrel, Mol. Phys., 3 (1960) 319
- [10] J.B. Birks, "Photophysics of Aromatic Molecules"; Wiley-Interscience: New York (1970)
- [11] S. Czarnecki, M. Kryszewski, J. Polimer. Sci., 1A (1963) 3067
- [12] K. Kawaoka, A.U. Khan, P.R. Kearns, J. Chem. Phys., 46 (1967) 1842
- [13] E. Wiedemann, Ann. Physik., 34 (1888) 446

- [14] A. Jablonskii, Z. Physik., 94 (1935) 38
- [15] J. Sklar, J. Chem. Phys., 5 (1937) 699
- [16] G. Lewis, M. Calvin, J. Am. Chem. Soc., 67 (1945) 994
- [17] D. F. Evans, Nature, 176 (1955) 777
- [18] M. Roth, J. Chromatogr., 30 (1967) 276
- [19] T. Vo-Dinh, "Room Temperature Phosphorimetry for Chemical Analysis"; Willey: New York (1984)
- [20] R. J. Hurtubise, "Solid Surface Luminiscence Anaysis: Theory, Instrumentation and Applications" ; M. Dekker : New York (1981)
- [21] E.M. Schulman, C.J. Walling, Science, 53 (1972) 178
- [22] E.M. Schulman, C.J. Walling, J. Phys. Chem., 77 (1973) 902
- [23] T. Vo-Dinh, A.M. Alak, Appl. Spectrosc., 41 (1987) 963
- [24] A.M. Alak, T. Vo-Dinh, Anal. Chem., 60 (1988) 596
- [25] S.M. Ramasamy, R. J. Hurtubise, Microchem. J., 40 (1989) 317
- [26] J.M. Bello, R.J. Hurtubise, Appl. Spectrosc., 40 (1986) 790
- [27] J.M. Bello, R.J. Hurtubise, Anal. Lett., 19 (1986) 775
- [28] J.M. Bello, R.J. Hurtubise, Anal. Chem., 59 (1987) 2395
- [29] J.M. Bello, R.J. Hurtubise, I bid, 60 (1988) 1285
- [30] J.M. Bello, R.J. Hurtubise, Anal. Chem., 60 (1988) 1291
- [31] J.M. Bello, R.J. Hurtubise, Appl. Spectrosc., 42 (1988) 619
- [32] M.D. Richmond, R.J. Hurtubise, Appl. Spectrosc., 43 (1989) 810
- [33] M.D. Richmond, R.J. Hurtubise, Anal. Chem., 61 (1989) 2643
- [34] C.A. Parker, C.G. Hatchard, J. Phys. Chem., 30 (1962) 276
- [35] J.J. Donkerbroek, N.J.R. Van Eikema Hommes, C. Gooijer, N.H. Velthorst, R.W. Frei, J. Chromatogr., 225 (1983) 581
- [36] J.J. Donkerbroek, C. Gooijer, N.H. Velthorst, R.W. Frei, Anal. Chem., 54 (1982) 891

- [37] J.J. Donkerbroek, C. Elzas, C. Gooijer, R.W. Frei, N. H. Velthorst, *Talanta*, 28 (1981) 717
- [38] J.J. Donkerbroek, A.C. Velthorst, A.J.J. Praat, C. Gooijer, R.W. Frei, N.H. Velthorst, *Appl. Spectrosc.*, 37 (1983) 188
- [39] C. Gooijer, N.H. Velthorst, R.W. Frei, *Trends Anal. Chem.*, 3 (1984) 259
- [40] R.W. Frei, N.H. Velthorst, C. Gooijer, *Pure Appl. Chem.*, 57 (1985) 483
- [41] J.J. Donkerbroek, C. Van Eikem Hommes, C. Gooijer, N.H. Velthorst, R.W. Frei, *Chromatographia*, 15 (1982) 218
- [42] A.G. Mwalupindi, I.M. Warner, *Anal. Chim. Acta*, 306 (1995) 49
- [43] L. Li, W. Huang, *Ibid*, 312 (1995) 345
- [44] L. Li, Y. Chen, A. Tong, *Huaxue Tomgbao*, 6 (1996) 46
- [45] L. Li, Y. Chen, Y. Zhao, A. Tong, *Anal. Chim. Acta*, 341 (1997) 241
- [46] A. Segura Carretero, C. Cruces Blanco, B. Cañabate-Díaz, A. Fernández-Gutiérrez, *Ibid*, 361 (1998) 217
- [47] L. Li, Y. Zhao, W. Yingguang, A. Tong, *Talanta*, 46 (1998) 1147
- [48] L. Mou, X.K. Chen, Y.G. Wu, L.D. Li, *Fenxi-Huaxue*, 26 (1998) 1504
- [49] A. Segura Carretero, C. Cruces Blanco, A. Fernández-Gutiérrez, *J. Agr. Food Chem.*, 46 (1998) 3683
- [50] A. Fernández-Gutiérrez, A. Segura Carretero, B. Cañabate-Díaz, C. Cruces Blanco, *Appl. Spect.*, 53 (1999) 741
- [51] C. Cruces Blanco, A. Segura Carretero, I. Ramírez García, A. Fernández-Gutiérrez, *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, 75 (1999) 377
- [52] A. Segura Carretero, C. Cruces Blanco, I. Ramírez García, B. Cañabate-Díaz, A. Fernández-Gutiérrez, *Talanta*, 50 (1999) 401
- [53] C. Cruces Blanco, A. Segura Carretero, J.F. Fernández Sánchez, A. Fernández-Gutiérrez, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 23 (2000) 845
- [54] A. Segura Carretero, C. Cruces Blanco, B. Cañabate-Díaz, J.F. Fernández-

- Sánchez, A. Fernández-Gutiérrez, *Anal. Chim. Acta*, 417 (2000) 19
- [55] A. Segura Carretero, C. Cruces Blanco, J.F. Fernández-Sánchez, B. Cañabate-Díaz, A. Fernández Gutiérrez, *J. Agric. Food Chem.*, 48 (2000) 4453
- [56] X. Chen, L. Mou, L. Li, *Chem. J. of Chinese Universities*, 20 (1999) 1052
- [57] L. Mou, X. Chen, L. Li, *Chem. I bid*, 20 (1999) 214
- [58] L. Mou, X.K. Chen, L.D. Li, *Fenxi-Huaxue*, 27 (1999) 509
- [59] Y.G. Wu, L.D. Li, A.J. Tong, *I bid*, 27 (1999) 881
- [60] L.D. Li, X.K. Chen, L. Mou, W.Q. Long, A.J. Tong, *Anal. Chim. Acta*, 424 (2000) 177
- [61] J.A. Murillo Pulgarín, A. Alañón Molina, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 368 (2000) 505
- [62] J.A. Murillo Pulgarín, A. Alañón Molina, *Luminescence*, 15 (2000) 99
- [63] J.A. Murillo Pulgarín, A. Alañón Molina, M.T. Alañon Pardo, *Analyst*, 126 (2001) 234
- [64] W. Jin, Y. Wei, A. Xu, C. Liu, *Spectrochim. Acta*, 50A (1994) 1769
- [65] S. Scypinski, L.J. Cline Love, *Anal. Chem.*, 56 (1984) 322
- [66] S. Scypinski, L.J. Cline Love, *I bid*, 56 (1984) 331
- [67] V.B. Nazarov, V.I. Gerko, M.V. Alfimov, *Izv. Akad. Nauk. Ser. Khim.*, 4 (1996) 1014
- [68] I. Tabushi, K. Fujita, L.C. Yuan, *Tetrahedrom Lett.*, 29 (1977) 2503
- [69] N.J. Turro, T. Okubo, C.J. Chung, *J. Am. Chem. Soc.*, 104 (1982) 1789
- [70] N.J. Turro, J.D. Bolt, Y. Kuroda, I. Tabushi, *Photochem Photobiol.*, 35 (1982) 69
- [71] N.J. Turro, G.S. Cox, X. Li, *I bid*, 37 (1983) 149
- [72] L.J. Cline Love, R. Weinberger, *Spectrochim. Acta*, 38B (1983) 1421
- [73] L.J. Cline Love, M.L. Grayeski, J. Norski, R. Weinberger, *Anal. Chim. Acta*, 170 (1985) 3

- [74] R.A. Femia, L.J. Cline Love, *J. Phys. Chem.*, 89 (1985) 1897
- [75] R.A. Femia, L.J. Cline Love, *Spectrochim. Acta*, 42A (1986) 1239
- [76] H.L. Casal, J.C. Netto-Ferreira, J.C. Scaiano, *J. Incl. Phenom. Mol. Recog. Chem.*, 3 (1985) 395
- [77] M.E. Díaz García, A. Sanz-Mendel, *Anal. Chem.*, 58 (1986) 1436
- [78] S. Zhang, C. Liu, Y. Bu, *Fenxi Huaxue*, 16 (1988) 494
- [79] S. Zhang, C. Liu, Y. Bu, *Ibid*, 16 (1988) 682
- [80] H. Kim, S.R. Crouch, *Anal. Chem.*, 61 (1989) 2475
- [81] R.A. Femia, L.J. Cline Love, *J. Coll. Interf. Sci.*, 108 (1985) 271
- [82] S. Hamai, *J. Am. Chem. Soc.*, 111 (1989) 3954
- [83] A. Muñoz de la Peña, I. Durán-Meras, F. Salinas, I.M. Warner, T.T. Ndou, *Anal. Chim. Acta*, 255 (1991) 351
- [84] S. Shuang, C. Liu, K. Feng, S. Zhang, *Fenxi Huaxue*, 19 (1991) 1265
- [85] Y. Wei, C. Liu, S. Zhang, *Fenxi Huaxue*, 18 (1990) 1001
- [86] Y. Wei, C. Liu, S. Zhang, *Ibid*, 19 (1991) 533
- [87] A. Ponce, P.A. Wong, J.J. Way, D.G. Nocera, *J. Phys. Chem.*, 97 (1993) 11137
- [88] A. Muñoz de la Peña, F. Salinas, M.J. Gómez, M. Sánchez-Peña, I. Durán-Merás, *Talanta*, 40 (1993) 1657
- [89] S. Hamai, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, (1994) 2243
- [90] S. Hamai *J. Phys. Chem.*, 99 (1995) 12109
- [91] A. Muñoz de la Peña, M. Pérez Rodríguez, G.M. Escáandar, *Talanta*, 51 (2000) 949
- [92] S. Hamai, N. Mononobe, *J. Photochem. Photobiol. A.*, 91 (1995) 217
- [93] Y.L. Chen, L.D. Li, *Fenxi Huaxue*, 23 (1995) 264
- [94] H.R. Zhang, Y.S. Wei, W.J. Jin, *Ibid*, 24 (1996) 1253
- [95] C.G. Gao, Y.S. Wei, W.J. Jin, C.S. Liu, *Ibid*, 24 (1996) 1015
- [96] X.Z. Du, Y. Zhang, X.Z. Huang, Y.B. Jiang, Y.Q. Li, G.Z. Chen, *Appl. Spectrosc.*,

50 (1996) 1273

[97] J. Xie, J. Xu, G. Chen, Ch. Liu, *Sci. China Chem.*, 39B (1996) 416

[98] X.Z. Du, Y. Zhang, X.Z. Huang, Y.Q. Li, Y.B. Jiang, G.Z. Chen, *Spectrochim. Acta*, 52A (1996) 1541

[99] X.Z. Du, Y. Zhang, X.Z. Huang, Y.B. Jiang, G.Z. Chen, *Spectrochim. Acta*, 53A (1996) 671

[100] H.R. Zhang, J. Zhang, Y.S. Wei, W.J. Jin, C.S. Liu, *Anal. Chim. Acta*, 357 (1997) 119

[101] X.Z. Du, Y. Zhang, Y.B. Jiang, L.R. Lin, X.Z. Huang, G.Z. Chen, *Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao*, 18 (1997) 1935

[102] Y. Zhao, L. Li, A. Tong, *Fenxi Huaxue*, 25 (1997) 1016

[103] A. Muñoz de la Peña, R. Manzano Durán (1999) Resultados no publicados

[104] J. Xie, D. Huang, J. Xu, G. Chen, *Chin. Sci. Bull.*, 42 (1997) 1468

[105] X.Z. Du, Y.B. Jiang, X.Z. Huang, G.Z. Chen, *Chin. Chem. Lett.*, 8 (1997) 431

[106] X.Z. Du, Y. Zhang, Y.B. Jiang, L.R. Lin, X.Z. Huang, G.Z. Chen, *Talanta* 44 (1997) 511

[107] S. Hamai, *J. Phys. Chem. B*, 101 (1997) 1707

[108] S. Hamai, T Kudou, *J. Photochem. Photobiol. A*, 113 (1998) 135

[109] A.S. Carretero, C.C. Blanco, A. Fernández-Gutiérrez, A. Muñoz de la Peña, *Appl. Spectrosc.*, 52 (1998) 420

[110] G.M. Escáandar, A. Muñoz de la Peña, *Anal. Chim. Acta*, 370 (1998) 199

[111] X.Z. Du, Y. Zhang, Y.B. Jiang, L.R. Lin, X.Z. Huang, G.Z. Chen, *Huaxue Xuebao*, 56 (1998) 453

[112] Y. Zhu, L. Li, A. Tong, *Guangpuxue Yu Guangpu Fenxi*, 18 (1998) 617

[113] H.R. Zhang, Y.S. Wei, F. Wu, C.S. Liu, *Fenxi-Huaxue*, 26 (1998) 77

[114] Q. Wang, L.D. Li, A.J. Tong, *Ibid*, 26 (1998) 271

[115] X.H. Bai, Y.S. Wei, C.S. Liu, *Ibid*, 26 (1998) 243

- [116] Y.P. Zhu, L.D. Li, A.J. Tong, *Fenxi-Shiyanshi*, 17 (1998) 6
- [117] C.G. Gao, Y.S. Wei, W.J. Jin, C.S. Liu, *Fenxi-Kexue-Xuebao*, 14 (1998) 292
- [118] S. Hamai, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 71 (1998) 1549
- [119] M. Algarra-González, M. Hernández-López, *Analyst*, 123 (1998) 2217
- [120] X.K. Chen, *Guangpuxue Yu Guangpu Fenxi*, 18 (1998) 742
- [121] A. Muñoz de la Peña, M. C. Mahedero, A. Espinosa-Mansilla, A. Bautista-Sánchez, M. Reta, *Talanta*, 48 (1999) 15
- [122] X.K. Chen, L. Mou, L.D. Li, A.J. Tong, *Fenxi Huaxue*, 27 (1999) 125
- [123] X.H. Bai, Y.S. Wei, C.S. Liu, *Ibid*, 27 (1999) 1292
- [124] L. Mou, X.K. Chen, L.D. Li, *Guangpuxue Yu Guangpu Fenxi*, 19 (1999) 880
- [125] S.Z. Zhang, Y.S. Wei, J.W. Xie, C.S. Liu, *Fenxi Huaxue*, 28 (2000) 678
- [126] A. Muñoz de la Peña, M.C. Mahedero, A. Bautista-Sánchez, *Analisis*, 28 (2000) 26
- [127] A. Muñoz de la Peña, M.C. Mahedero, A. Bautista-Sánchez, *Anal. Lett.*, 34 (2001), 2391
- [128] L.D. Li, X.A. Hai, A.J. Tong, *Spectrochim. Acta*, 56A (2000) 1513
- [129] G.M. Escáandar, A. Muñoz de la Peña, *Appl. Spectrosc.*, (2001), (en prensa)
- [130] G.M. Escáandar, M.A. Boldrini, *Talanta*, 53 (2001) 851

I.D.-FLUORESCENCIA INDUCIDA FOTOQUÍMICAMENTE A TEMPERATURA AMBIENTE [1]

I.D.1.- Fundamento teórico

I.D.2.- Tipos de reacciones

I.D.2.1.- Reacciones de fotociclación

I.D.2.2.- Reacciones de fotoisomerización

I.D.2.3.- Reacciones de fotólisis

I.D.2.4.- Reacciones de fotooxidación

I.D.2.5.- Reacciones de fotorreducción

I.D.3.- Instrumentación

I.D.4.- Aplicaciones analíticas

I.D.5.- Bibliografía

La fluorescencia molecular es un método de análisis potente dada la alta sensibilidad y selectividad que posee. Sin embargo, muchos compuestos presentan una nula o muy débil fluorescencia, lo que hace que su determinación fluorimétrica sea inviable o de muy baja sensibilidad.

A veces, la radiación UV produce la fotólisis del analito originándose cambios en su fluorescencia. Este fenómeno ha dado lugar, recientemente, a que se haya propuesto una modificación que mediante el uso de reacciones fotoquímicas aumente la sensibilidad, selectividad y reproducibilidad de la detección fluorimétrica. Este método se denomina "Fluorescencia inducida fotoquímicamente a temperatura ambiente" (Room Temperature Photoinduced Fluorescence), "RTPF" o simplemente "fluorescencia fotoinducida", (Photo-Induced Fluorescence), que denominaremos con las siglas PIF.

Cuando el fotoproducto formado es menos fluorescente que el analito la señal medida es la disminución de la fluorescencia. No obstante, en la mayoría de los compuestos la reacción fotoquímica conlleva un aumento del coeficiente de absorción y del rendimiento cuántico de fluorescencia con relación a los del analito. Por tanto, el aumento de la señal de fluorescencia del fotoproducto origina un aumento de la sensibilidad de la detección fluorimétrica.

I.D.1.- FUNDAMENTO TEÓRICO

Los aspectos teóricos de la PIF han sido estudiados por varios autores [2-4].

En disolución diluida, si la absorbancia es inferior a 10^{-2} , la velocidad de fotorreacción de un analito viene dada por la expresión:

$$v = -\frac{dC_A}{dt} = \frac{dC_B}{dt} = \sum_{\lambda_p} \phi_{\lambda_p} I_{0,\lambda_p} a_{\lambda_p} b C_A \quad (1)$$

en ésta, el sumatorio afecta a aquellas longitudes de onda incidentes que producen fotorreacción. El resto de las variables son:

- $M_{\delta p}$: Rendimiento cuántico de fluorescencia
- $I_{0,\delta p}$: Intensidad incidente a cada δ .
- $a_{\delta p}$: $2.303 \times g_A$, donde g_A es la absortividad molar a cada δ .
- b : Camino óptico.
- C_A : Concentración del analito.
- C_B : Concentración del fotoproducto.

Si admitimos que $I_{0,\delta p}$ es constante y mucho mayor que C_A la expresión anterior se puede transformar en la ecuación de primer orden:

$$(C_A)_t = (C_A)_0 10^{\left[-\sum_{\lambda_p} \phi_{\lambda_p} I_{0,\lambda_p} a_{\lambda_p} b t \right]} \quad (2)$$

en donde $(C_A)_t$ es la concentración del analito a un tiempo t y $(C_A)_0$ su concentración inicial.

Llegados a este punto han de considerarse dos posibilidades:

1.- Que el analito sea fluorescente y el fotoproducto no, por tanto, tiene lugar una disminución de fluorescencia .

2.- Que el analito sea débilmente fluorescente o no fluorescente y el fotoproducto sea fuertemente fluorescente, en consecuencia, se observa un aumento en la fluorescencia.

Se trata, ahora, de estudiar de qué forma están relacionados la concentración inicial de analito con la señal de fluorescencia final.

I.D.1.1.- Expresión de la intensidad para una disminución de la fluorescencia

La intensidad de fluorescencia, I_{FA} , del analito viene dada por la expresión:

$$I_{FA} = f(\theta)g(\lambda') \sum_{\lambda_{FA}} \phi_{FA} I_{0, \lambda_{FA}} a_{\lambda_{FA}} b C_A \quad (3)$$

siendo $f(2)$ el factor geométrico y $g(8')$ la respuesta del detector a la longitud de onda analítica. En esta expresión 8 se refiere a la longitud de onda de excitación del analito. El resto de las variables tienen el mismo significado que en la expresión anterior.

Si observamos las expresiones **(1)** y **(3)**, son similares dado que ambas se refieren a procesos competitivos de disipación de energía desde un mismo estado singlete excitado que se ha alcanzado tras un proceso de absorción simple.

Admitiendo que la intensidad de la radiación incidente es constante, la velocidad de la disminución de la intensidad de fluorescencia del analito, dada en la expresión **(3)**, sólo depende de la concentración de C_A y por tanto la segunda expresión indica que la fotorreacción es de primer orden en $(C_A)_t$.

Para medir la concentración inicial del analito, $(C_A)_0$, se han propuesto tres procedimientos:

g Método de la velocidad inicial.- Dado que la velocidad inicial de la fotorreacción es una medida de $(C_A)_0$, el método se basa en extrapolar la curva intensidad de fluorescencia frente al tiempo a $t = 0$.

g Medida directa de la fluorescencia.- Consiste en medir, a un tiempo constante, la intensidad que es proporcional a $(C_A)_0$, para un tiempo dado.

g Integración digital de la señal de fluorescencia en un intervalo de tiempo dado.- La señal integrada es proporcional a la concentración inicial de analito, como se deduce a continuación.

Teniendo en cuenta las expresiones **(2)** y **(3)**, definimos los parámetros:

$$K = \sum_{\lambda_p} \phi_{\lambda_p} I_{0, \lambda_p} a_{\lambda_p} b \quad (4)$$

$$\chi = f(\theta)g(\lambda') \sum_{\lambda_{FA}} \phi_{FA} I_{0, \lambda_{FA}} a_{\lambda_{FA}} b \quad (5)$$

La señal de fluorescencia del analito a cualquier tiempo vendrá dada por la expresión

$$(I_{FA})_t = \chi(C_A)_t = \chi(C_A)_0 10^{(-kt)} \quad (6)$$

Si integramos a un intervalo de tiempo **J**, obtendremos la señal de fluorescencia integrada

$$(I_{FA})_{\text{int}} = \int_0^{\tau} (I_{FA})_t dt = (C_A)_0 \chi \int_0^{\tau} 10^{(-kt)} dt \quad (7)$$

y por tanto

$$(I_{FA})_{\text{int}} = -\frac{\chi}{k} (C_A)_0 10^{(-kt)-1} \quad (8)$$

Usando el mismo valor de J para todas las integraciones, al representar $(I_{FA})_{\text{int}}$ frente a $(C_A)_0$ tendremos una calibración.

I.D.1.2.- Expresión de la intensidad de fluorescencia para un aumento de fluorescencia

Tomemos ahora una reacción fotoquímica simple, como es la transformación de un analito A, en el fotoproducto, B. La concentración de este último a un tiempo t será:

$$(C_B)_t = (C_A)_0 - (C_A)_t$$

y teniendo en cuenta la expresión (2) tendremos

$$(C_B)_t = (C_A)_0 \left[1 - 10^{\left(-\sum_{\lambda_p} \phi_{\lambda_p} I_{0,\lambda_p} a_{\lambda_p} b t \right)} \right] \quad (9)$$

De modo que la intensidad de fluorescencia del fotoproducto, (I_{FB}) , será

$$I_{FB} = f(\theta)g(\lambda') \sum_{\lambda_{FB}} \phi_{FB} I_{0,\lambda_{FB}} a_{\lambda_{FB}} b C_B \quad (10)$$

En esta expresión, los diferentes parámetros tienen el significado que anteriormente hemos definido, pero ahora están referidos al fotoproducto B.

Por tanto, si la intensidad de la radiación incidente es constante, la variación de la intensidad de fluorescencia del fotoproducto sólo depende de C_B y estas variaciones corresponden a las de la concentración del fotoproducto, C_B .

Las expresiones de K y P serán:

$$K = \sum_{\lambda_p} \phi_{\lambda_p} I_{0,\lambda_p} a_{\lambda_p} b \quad (11)$$

y

$$\chi = f(\theta)g(\lambda') \sum_{\lambda_{FB}} \phi_{FB} I_{0,\lambda_{FB}} a_{\lambda_{FB}} b \quad (12)$$

y obtendremos la señal de fluorescencia del fotoproducto a tiempo "t"

$$(I_{FB})_t = \chi(C_B)_t = \chi(C_A)_0 [1 - 10^{-kt}] \quad (13)$$

Si empleamos el mismo tiempo para todas las medidas, al representar la señal de fluorescencia del fotoproducto, $(I_{FB})_t$, frente a la concentración de analito inicial, $(C_A)_0$, obtendremos una calibración. No obstante, puede no encontrarse linealidad si se produce más de un fotoproducto.

En estas condiciones, si la fotorreacción de un analito no fluorescente o débilmente fluorescente conduce a un fotoproducto fluorescente, la fluorescencia fotoinducida permite la determinación de este tipo de compuestos.

I.D.2.-TIPOS DE REACCIONES

Para que una reacción sea útil desde el punto de vista analítico debe reunir los siguientes requisitos:

- El analito debe absorber fuertemente en el UV para iniciar la reacción fotoquímica.
- La radiación absorbida debe ser de una longitud de onda que no sea absorbida significativamente por el, o los, fotoproductos.
- Deberá haber un aumento de la rigidez estructural o de la aromaticidad de los fotoproductos que dé lugar a un aumento del coeficiente de absorción y a un rendimiento cuántico de fluorescencia mayores que los del analito.
- Química y térmicamente, los fotoproductos deberán ser estables al menos en el intervalo de tiempo necesario para la realización de las medidas.
- El proceso de fotoconversión debe ser muy eficiente y tener un alto rendimiento fotoquímico.

Los principales tipos de reacciones empleados en procesos fotoquímicos son:

I.D.2.1.- Reacciones de fotociclación

Son ejemplos de este tipo de reacciones la conversión de estilbenos en derivados de fenantreno altamente fluorescentes [5-7]. Tal es el caso de clomifeno, estimulante ovulatorio no esteroide, en el que se postula un cierre de anillo con formación de un derivado de fenantreno. Otro ejemplo de fotociclación es el de

tamoxifen [6,7], inhibidor de una hormona, y de dos de sus metabolitos, como son N-desmetiltamoxifen y 4-hidroxitamoxifen que se transforman en derivados de antraceno tras una irradiación UV de 12 a 23 s.

I.D.2.2.- Reacciones de fotoisomerización

Purpurogalina [8] se transforma en un derivado de naftaleno altamente fluorescente tras un tiempo de irradiación largo (65 min). Por contra, el ansiolítico loracepam [9] se transforma tras 5-30 min en un fotoisómero altamente fluorescente cuya estructura se ha propuesto mediante IR, RMN y MS.

I.D.2.3.- Reacciones de fotólisis

Este tipo de reacciones son bastante numerosas [10-12] por lo que vamos a citar sólo algunas de ellas a modo de ejemplo.

Los complejos de n-butil-2-naftilmetilditiocarbamatos (BNMDTC) con metales de transición, Fe (III), Co (II), Ni (II) y Hg (II), se transforman en butilnaftilmetilamina (BNMamina) cuya formación se confirma por absorción UV y HPLC [13].

Otras reacciones de este tipo son las observadas en varios tipos de pesticidas aromáticos [12], que sólo presentan fluorescencia tras la irradiación. Entre ellos podemos citar herbicidas de la familia de las benzoilureas [14] y fenilureas [15].

I.D.2.4.- Reacciones de fotooxidación

Un ejemplo típico de este tipo de reacciones, ampliamente estudiada, es la fotooxidación de fenotiacinas [16]. Originan intensidades de fluorescencia elevadas con tiempos de irradiación de 30 a 60 s, pero la fluorescencia de los fotoproductos

depende básicamente de la naturaleza del sustituyente en posición 2 del anillo de fenotiacina. Para fenotiacinas trifluorosustituidas como la fluofenacina o trifluoperacina, los máximos de excitación y emisión de los productos de fotooxidación y de los obtenidos por oxidación química son similares. Por contra, en los derivados clorados como perfenacina y clorpromacina, las características espectrales de los productos fotooxidados y oxidados químicamente son diferentes. Un ejemplo es el del azure A [17] que bajo irradiación UV forma un compuesto de oxidación, derivado sulfóxido, tras 6 min de irradiación.

I.D.2.5.- Reacciones de fotorreducción

La fotorreducción anaerobia de quinonas no fluorescentes es bastante empleada. Las quinonas son reducidas a hidroquinonas muy fluorescentes y esta reacción puede ser utilizada para la detección de compuestos donores de hidrógeno [18,19], o la detección de las propias quinonas. Así, se ha aplicado a la determinación de alcoholes, éteres, aldehídos, sacáridos, hidrocortisona, herbicidas derivados de dinitroanilinas [19], y vitamina K₁.

I.D.3.- INSTRUMENTACIÓN

En un equipo para medida de fluorescencia fotoinducida, el componente diferenciador de un espectrofluorímetro clásico es el fotorreactor, siendo ésta la parte fundamental del sistema.

En la actualidad no existen comercializados instrumentos para PIF, como tales, por lo que diferentes fotorreactores han sido diseñados, con el paso de los años, por los propios investigadores.

Los primeros fotorreactores estaban constituidos por lámparas de mercurio de media o alta presión refrigeradas por agua o bien por lámparas de xenon o xenon-Hg refrigeradas por aire. En todos los casos el analito circulaba por el interior de un capilar de cuarzo arrollado sobre la lámpara que permitía, dada su buena transparencia a la radiación UV, la irradiación del analito. Uno de los primeros diseños de fotorreactor es el que se esquematiza en la Figura I.D.1.

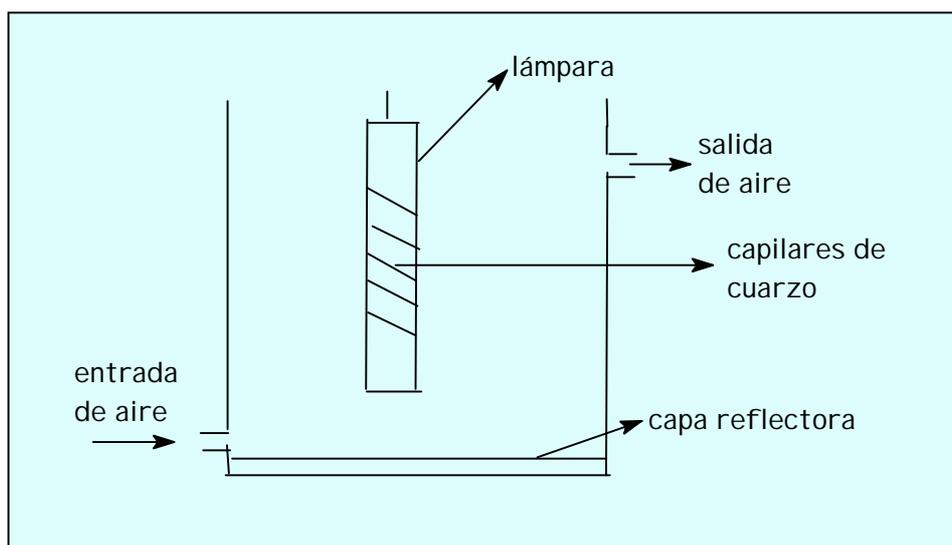


Figura I.D.1. - Esquema de uno de los primeros fotorreactores.

La fragilidad y dificultad de manejo del cuarzo llevó a Scholten, en 1980, a proponer el teflón (politetrafluoroetileno, PTFE) como material para los capilares. Su transparencia a la radiación UV es debida a múltiples procesos de reflexión que hacen que la radiación pase a través de los poros del polímero. Se encuentra comercializado en diferentes diámetros, su costo es bajo y los resultados encontrados en HPLC muestran que los picos son más simétricos y sufren menos ensanchamiento que los obtenidos con capilares de cuarzo, mientras que las señales de fluorescencia son similares.

Por todas estas razones, finalmente, el cuarzo fue sustituido por el teflón y en 1983, Lang diseña el primer fotorreactor con capilares de este material. Éstos están enrollados sobre un cilindro de cuarzo, en cuyo interior se encuentra la lámpara que se mantiene a 25 ° refrigerando con agua. Pero uno de los inconvenientes del uso del teflón estriba en que se liberan cantidades significativas de F^- y H^+ cuando la temperatura se acerca a los 50 °C. La liberación de F^- es función del tiempo de residencia del analito en el capilar y puede dar lugar a un aumento de la señal de fondo y una variación de la fluorescencia del compuesto en estudio.

Para minimizar el efecto de la temperatura y simplificar su construcción, se propuso el uso de las lámparas de baja presión. Así, en 1982, para llevar a cabo una fotorreducción de alcoholes, aldehídos, éteres, aminas, etc..., se diseñó un fotorreactor, como el esquema que se muestra en la Figura I.D.2, en el que los capilares están tejidos sobre unas barras que se soportan en un cilindro de cuarzo, dentro del cual se encuentra la lámpara.

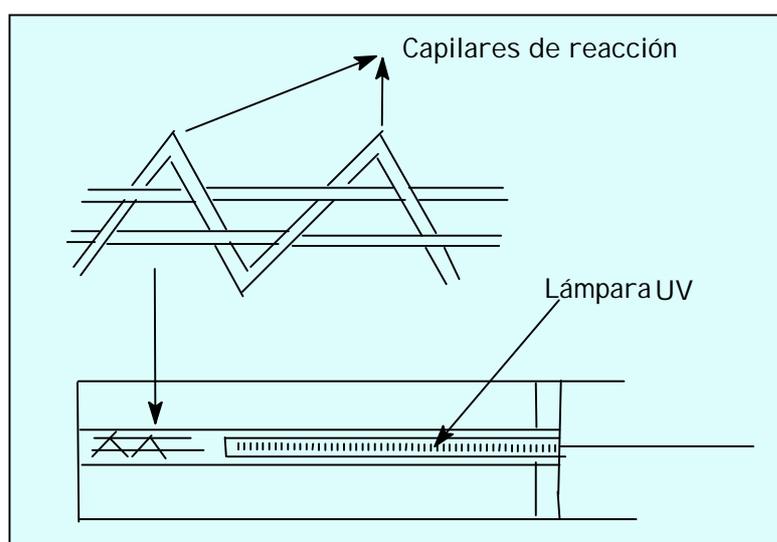


Figura I.D.2. - Esquema de un fotorreactor con lámparas de baja presión.

Son numerosos los casos en que las reacciones fotoquímicas son utilizadas como derivatizaciones post-columna en HPLC, consiguiéndose grandes aumentos de sensibilidad y selectividad. Un esquema general del montaje HPLC-PI F consta de tres elementos conectados en serie: columna, fotorreactor y fluorímetro, con un diseño como el de la Figura I.D.3.

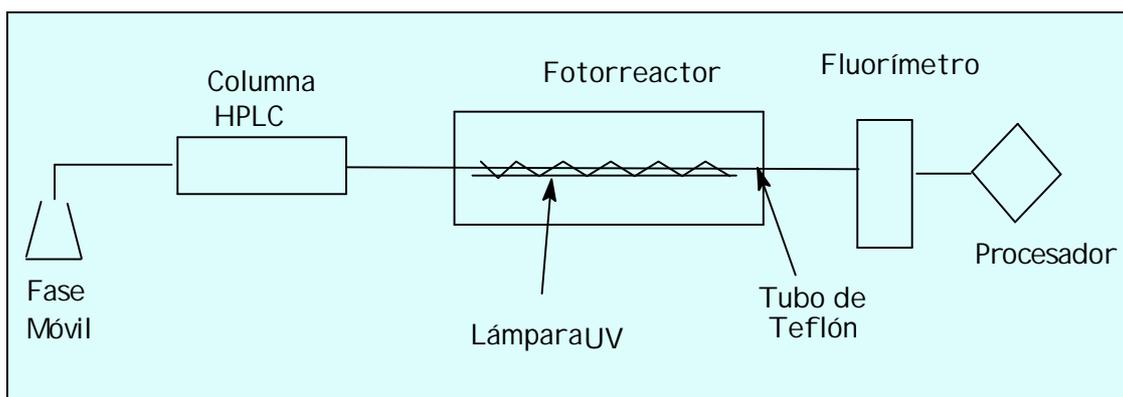


Figura I.D.3. - Esquema del acoplamiento HPLC-PI F.

A veces, los fotorreactores se introducen dentro de una camisa que mediante paso de N_2 evita la difusión de oxígeno a través de los poros del teflón, Figura I.D.4.

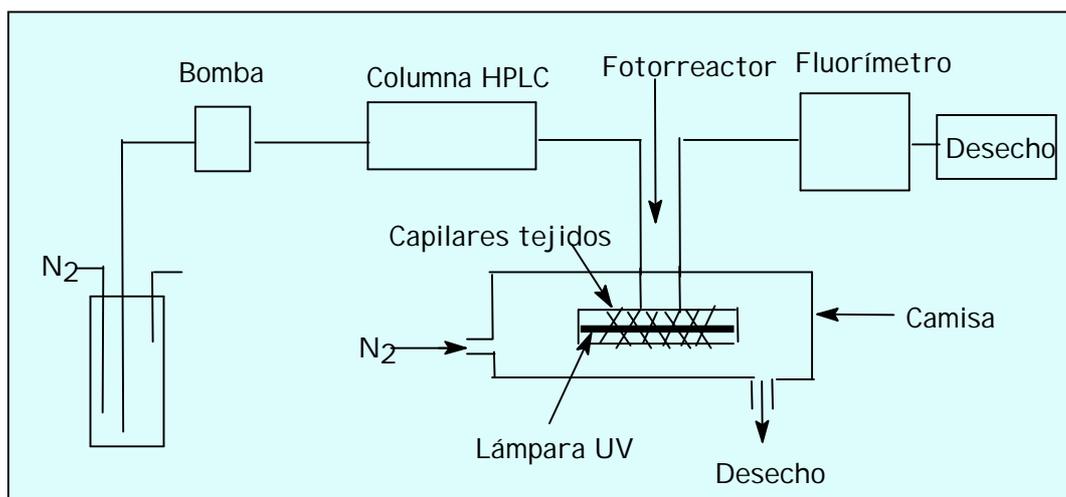


Figura I.D.4. - Esquema del diseño de un fotorreactor con paso de N_2

Por último, Arakawa [10], en 1983, propone el uso de un fotorreactor en el que se emplea una lámpara de Hg de baja presión y concéntrico a ella un cilindro de cuarzo. Sobre él va enrollado el capilar de teflón por el que circula la solución en estudio, tal y como se esquematiza en la Figura I.D.5.

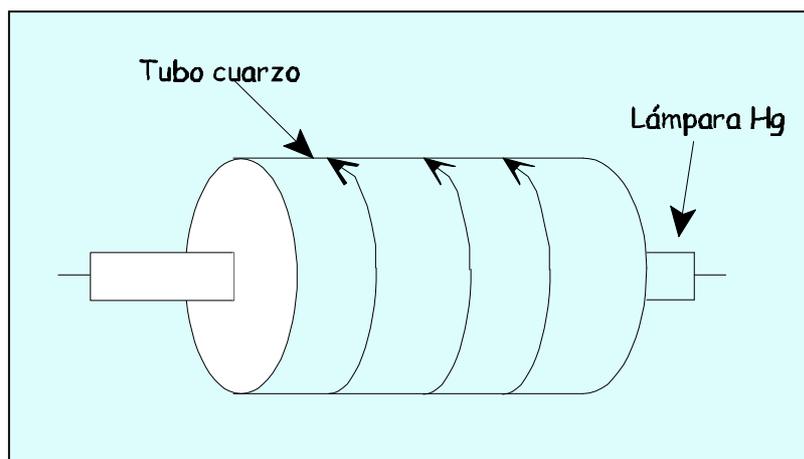


Figura I.D.5.- Esquema del diseño de un fotorreactor con lámpara de Hg.

I.D.4.- APLICACIONES ANALÍTICAS

La fluorescencia inducida fotoquímicamente a temperatura ambiente es una técnica muy versátil, por lo que sus aplicaciones son múltiples y se llevan a cabo en diferentes campos. Se han realizado estudios de PIF en medio estacionario o disolución, sobre soporte sólido y mediante acoplamiento con técnicas en flujo, FIA y HPLC.

En cuanto a los campos de aplicación, encontramos el uso de esta técnica en análisis de residuos de pesticidas, análisis farmacológico-clínico, y el resto de ellas que podemos denominar aplicaciones generales.

A modo de breve reseña histórica de la evolución de PIF, en cuanto a sus aplicaciones, diremos que es empleada por primera vez en 1973, por Lukasiewicz y Fitzgerald [3] para la determinación, en disolución, de compuestos de interés biológico tales como DL-triptófano, dopamina o sulfato de quinina, entre otros. En dichas aplicaciones, la determinación se basa en una disminución de la señal de fluorescencia medida a un tiempo de irradiación fijo.

Casi al mismo tiempo, White y col. [16], en 1976, aplican la técnica, también en disolución, para la determinación de varias fenotiacinas, en este caso en base al aumento de fluorescencia originado por la fotooxidación de los analitos.

Las aplicaciones de PIF sobre soporte sólido son mucho más escasas y aparecen, por primera vez, en 1981, año en el que Aaron y Fidanza proponen la determinación de diversos antimaláricos como clorquina [20,21], plasmocid [22] o primaquina [23] empleando como soporte sólido sílica gel. Unos años más tarde, los mismos autores, determinaron teofilina y clorquina [24] sobre papel de filtro.

Las primeras utilizaciones de esta técnica, como sistema de detección en HPLC, aparecen en 1980 para la determinación de fármacos. Así, Scholten y col. determinan en suero y orina clobazan y desmetilclobazan [25] y varias fenotiacinas [26].

Unos años más tarde, en 1982, el acoplamiento HPLC-PIF es propuesto por Werkhoven-Goewie y col. [27] para la determinación de herbicidas de las familias de los clorofenoles y fenilureas, en agua.

En cuanto al acoplamiento FIA-PIF, se utiliza en 1984, por Shih y Carr [13]

para el estudio de complejos metálicos con n-butil-2-naftilmetilditiocarbamato y no es hasta 1991 cuando Chen y col. [28] determinan tres fenotiacinas mediante stopped-flow acoplado a un fotorreactor. Las primeras aplicaciones a la determinación de pesticidas con este sistema no aparecen hasta 1996 [29,30].

Por último, citar que la técnica es empleada en diversos estudios. Así, en 1982, Gandelman y col. [18] la emplean para estudiar, mediante HPLC, la fotorreducción de doce compuestos alifáticos oxigenados y en 1984, los ya citados complejos metálicos con n-butil-2-naftilmetilditiocarbamato [13].

Finalizado este breve recorrido histórico sobre los inicios de la utilización de la PIF en los diferentes campos de aplicación, resumimos a continuación, las aplicaciones analíticas de la misma.

Dado que el objeto de esta Memoria es el estudio y puesta a punto de nuevos métodos para la determinación de pesticidas, comenzaremos el resumen con los antecedentes bibliográficos sobre la determinación de pesticidas.

[9 Determinación de pesticidas](#)

Como ya se ha dicho, la primera aplicación de la PIF a la determinación de pesticidas, se efectúa en 1982, año en el que se emplea acoplada a técnicas de HPLC. Así, Werkhoven-Goewie y col. [27] determinan, por un lado, cuatro clorofenoles: 2-clorofenol, 3-clorofenol, 4-clorofenol y 2,4-diclorofenol. En todos los casos la fase móvil es MeOH:H₂O, siendo los métodos más sensibles los correspondientes a los derivados monoclorados en posiciones 2- ó 3-, y el menos sensible, el del derivado diclorado. Por otra parte, en la misma publicación, proponen la determinación de siete

herbicidas de la familia de las fenilureas, entre las que se encuentran monurón, fluometurón, diurón, sidurón, linurón, clorbromurón y neburón, siendo los métodos más sensibles los correspondientes a fluometurón y sidurón.

Una opción empleada con mucha frecuencia es la fotólisis post-columna seguida de una derivatización con OPA/MERC. En ese sentido, Luchtefeld [31] propone la determinación de diurón, linurón y monurón en zanahorias, con un tiempo de fotólisis o irradiación de 44 s, empleando como fase móvil acetonitrilo:agua, ACN:H₂O, y con límites de detección inferiores a 12, 24 y 4 ng mL⁻¹, respectivamente.

Con la misma derivatización, en 1987, Miles y Moyer [32] determinan tiobencarb en vegetales y metiocarb en agua, empleando, en ambos casos, ACN:H₂O como fase móvil y un tiempo de fotólisis de 336 s.

Los mismos autores [12] determinan aldicarb, propoxur, tiram y neburón en agua subterránea, siendo el método más sensible el de este último, con un límite de detección de 0.8 ng mL⁻¹. Al igual que los anteriores, hacen uso de la derivatización con OPA-MERC y proponen la determinación de tres fenilureas, monurón, fluometurón y clorbromurón. El método más sensible es el del primero de ellos. También, proponen el análisis de los anteriores compuestos mediante HPLC sin derivatizar, empleando el mismo tiempo y como fase móvil ACN:H₂O, para monurón y clorbromurón y MeOH:H₂O para fluometurón.

Patel y col. [33] empleando HPLC y derivatización tras la fotólisis, proponen métodos para la determinación de ocho pesticidas. Difenamid y molinate son estudiados utilizando como fase móvil, tanto H₂O como MeOH:H₂O. En todos los casos, el tiempo de fotólisis es de 168 s, las recuperaciones, en muestras de agua, en

torno al 100 %, y los límites de detección más bajos cuando la fase móvil empleada es MeOH:H₂O. Métodos similares se proponen para EPTC y tiobencarb empleando como fases móviles H₂O o ACN:H₂O. La sensibilidad del método es mayor con esta última fase móvil. Daminozide se determina con un límite de detección de 1 ng mL⁻¹ y fase móvil acetonitrilo:H₂O, mientras que para trifluoralina y paraquat se emplea MeOH:H₂O y para dinoseb MeOH:H₂O con un 0.5 % de acetona.

En 1991, los mismos autores, también proponen la determinación, en agua subterránea, de seis pesticidas [34] mediante HPLC con detección PIF, sin derivatización. Para carboxin, difenamid y fenoxicarb, la fase móvil es MeOH:H₂O, con límites de detección de 5, 50 y 5 ng mL⁻¹, respectivamente. Para alaclor y butaclor se emplea MeOH y para carbetamida, ACN:H₂O, con un 2 % de acetona, siendo este último el método menos sensible.

Fenarimod, napronamida y propanil [35] son determinados mediante HPLC-PIF, sin derivatización, empleando ACN:H₂O como fase móvil, 78 s de fotólisis y obteniendo límites de detección comprendidos entre 1.5 y 0.5 ng mL⁻¹. Los mismos pesticidas se determinan con derivatización, en las condiciones anteriores, encontrando menor sensibilidad, de 3.4 a 9.5 ng mL⁻¹. Todos ellos son aplicados a su análisis en agua subterránea.

Mediante HPLC con fotólisis post-columna y complejación con morina, Stab y col. [36] determinan, con tiempos muy bajos, 9 s, pesticidas triorgano-estannosos tales como hidróxido de triciclohexil-estaño (TCT), en aguas superficiales, sedimentos y suelos. Como fase móvil emplean n-hexano:THF:AcH (96:2:2). Las recuperaciones y límites de detección varían en función de la muestra real analizada.

Por último, A. Muñoz de la Peña y col [37] determinan y separan mezclas ternarias de fenilureas, entre las que se incluyen diurón, isoproturón, linurón y neburón, empleando como fase móvil ACN: tampón fosfato (60:40) a pH 7, en muestras de agua potable y de río. Los analitos son irradiados durante 210 s, a su paso por el fotorreactor que está acoplado al sistema HPLC. Los límites de detección oscilan entre 30-180 ng mL⁻¹.

Las aplicaciones de la fluorescencia inducida fotoquímicamente en medio estacionario o disolución, también son numerosas y en ellas se han empleado medios acuoso, acuoso-orgánicos y micelares.

En 1987, Traore y Aaron [19] estudian cuatro herbicidas no fluorescentes de la familia de las dinitroanilinas, entre las que se encuentran orizalina, trifluoralina, benfluoralina e isopropalina empleando la fotorreducción con antraquinona-2,6-sulfonato. Los límites de detección están comprendidos entre 0.3 y 4.2 ng mL⁻¹ y los tiempos de irradiación son inferiores a 4 minutos.

En formulaciones comerciales, Coly y col. [38] proponen la determinación de fenitrotión en dimetilsulfóxido (DMSO), con 96 s de irradiación y 0.7 ng mL⁻¹ de límite de detección y fenvalerato, en acetonitrilo, con límite de detección de 8.7 ng mL⁻¹. Por último, en medio MeOH y 2-PrOH se determinan deltametrín y diflubenzurón, respectivamente, con recuperaciones en torno al 100 %.

Eremin y col. [39] ponen a punto un método en el que se analizan los fenoxiácidos MCPP, MCPA, 2,4-D y 2,4,5-T, en medio MeOH:tampón de pH 5. Los tiempos de irradiación empleados son de 15 minutos. Aplican el método a la determinación de MCPP en agua de río.

Fenvalerato y deltametrín [40] pueden ser determinados en dos medios: acetonitrilo y medio micelar, SDS. En este último, los métodos son más sensibles y las recuperaciones en formulaciones comerciales están próximas al 100 %. Por contra, en MeCN los tiempos de irradiación son menores.

A. Coly y col. [41] proponen el análisis, en agua de río, de herbicidas de la familia de las sulfonilureas. Se ensayan distintos disolventes tales como agua, DMSO, ACN, MeOH, 2-propanol y también disoluciones micelares de SDS y CTAC. Las disoluciones de los herbicidas fueron irradiadas durante tiempos inferiores a 3 minutos, encontrándose recuperaciones comprendidas entre 80-104 %.

Recientemente [42], también se analizan las sulfonilureas antes mencionadas en medios micelares de SDS o CTAC, empleando técnicas de derivada y detectando las especies mediante PIF. Se resuelven mezclas binarias de metil-sulfometurón y 3-rimsulfurón, o bien, metil-metsulfurón y metil-clorsulfurón, en agua potable.

Se pone a punto un método de determinación de las fenilureas diurón, isoproturón, linurón y neburón [43], empleando medio 2-propanol y sus mezclas acuosas. Los tiempos de irradiación oscilan entre 7 y 12 min, dependiendo del medio y la fenilurea analizada. Los mismos herbicidas [15] fueron determinados en medio micelar, SDS y CTAC, con límites de detección comprendidos entre 410 y 640 ng mL⁻¹, en función del compuesto. El método se aplica al análisis en agua de río y agua potable.

MCPP y 2-4-D [44] son determinados en agua potable, empleando como medio micelar CTAC. Los límites de detección son de 10.8 y 13.1 ng mL⁻¹, para 2,4-D y

MCPPP, respectivamente y las recuperaciones oscilan entre 93 y 100 %.

Además de los medios micelares, también han sido utilizados otros medios organizados, como las ciclodextrinas, para la obtención de fluorescencia inducida fotoquímicamente. Así, Coly y col. [45] estudian la señal PIF de clorpirifos, deltametrín y fenvalerato, en presencia de β -CD y HP- β -CD. Hallan las estequiometrias de los complejos formados así como las constantes de formación, aplicando el método a la determinación de estos compuestos en agua potable y de río.

Muñoz de la Peña y col. [46] calculan las constantes de formación y las estequiometrias de los complejos formados con diurón, linurón y neburón y aplican el método propuesto a la determinación de estas especies en agua [47].

Varias benzoilureas como flufenoxurón, lufenurón, hexaflumurón y triflumurón pueden ser determinadas en agua y formulaciones técnicas [14]. Las mayores señales de fluorescencia, así como los menores tiempos de irradiación son obtenidos en medio metanólico, etanólico y 2-propanólico. Las recuperaciones oscilan entre el 95 y 110 %, para las muestras de agua, y entre 92 y 101 %, en las formulaciones comerciales.

Las aplicaciones de PIF acopladas a técnicas de flujo son escasas. Así, en 1996, Coly y Aaron [31] mediante FIA con detección PIF, determinan fenitrotión en formulaciones comerciales, empleando DMSO:H₂O con un tiempo de irradiación inferior a 1 min, y recuperaciones que oscilan entre 96 y 107 %. Fenvalerato puede ser determinado empleando MeOH o ACN, siendo aplicado a formulaciones comerciales en el primer caso y a agua potable en el segundo. En ambos casos, los tiempos de irradiación no superan los 2 minutos, siendo la sensibilidad menor cuando se emplea ACN. Con tiempo de irradiación similar al empleado en los dos casos

anteriores, se analiza deltametrín, en formulaciones comerciales y agua potable. Por último, diflubenzurón es determinado en formulaciones comerciales, tras 89 s de irradiación, en medio 2-propanol.

Los mismos autores [48], con acoplamiento FIA-PIF y utilizando medios micelares, SDS y CTAC, determinan clorsulfurón, metil-metsulfurón y metil-sulfometurón, en agua de río, previa extracción con CH_2Cl_2 y 3-rimsulfurón, extrayendo con acetato de etilo.

La técnica anterior, también es empleada para el análisis de MCPP y 2,4-D, en agua potable, utilizando medios micelares de CTAC [49]. Los tiempos de irradiación fueron de 10 y 15 min para MCPP y 2,4-D, respectivamente.

Empleando stopped-flow, se determina MCPA, MCPP y MCPB en agua de río, tras 90 s de irradiación, mientras que en las mismas condiciones 2,4-D y 2,4-DP necesitan tiempos mayores [30].

G Determinaciones farmacológica-clínicas

El segundo de los citados campos de aplicación de la PIF es el dedicado al análisis de fármacos y compuestos de interés clínico.

Como vimos anteriormente, los comienzos de la aplicación de esta técnica, tanto en medio estacionario, como en sistemas en flujo, HPLC o FIA, fueron métodos de análisis de principios activos de fármacos, siendo quizás éste el campo de aplicación más amplio de esta técnica.

Para no hacer excesivamente extensa esta introducción, a continuación, hacemos una recopilación, no detallada, de los compuestos para los que se han propuesto métodos de análisis.

En términos generales, podemos decir que muchos de estos métodos están aplicados, fundamentalmente, al análisis en fármacos y fluidos biológicos, sobre todo, suero, plasma y orina.

En solución, los medios empleados son acuoso, alcohólicos (metanol, etanol y 2-propanol) o sus mezclas acuosas, mientras que en HPLC las fases móviles más utilizadas son ACN:H₂O y ACN:MeOH:H₂O.

En cuanto a los tiempos de irradiación, éstos son más cortos en sistemas en flujo, en los que se encuentran con frecuencia tiempos del orden de varios segundos, pero en todo caso, inferiores a 2 minutos. En medio estacionario, la irradiación es más larga aunque también se proponen métodos con tiempos cortos, del orden de 10-15 s.

Con relación a los analitos determinados, la gama de éstos es muy amplia. Así, podemos encontrar antimaláricos, antiinflamatorios, estrógenos, estimulantes ovulatorios no esteroides, glicósidos cardíacos, antiestrógenos, vitaminas, catecolaminas, aminoácidos, antibióticos, analgésicos, antihistamínicos, ansiolíticos y antidepresivos, entre otros.

En la década de los setenta, en medio estacionario se proponen métodos para el análisis de varios aminoácidos, tales como fenilalanina, triptófano y derivados [3], varias tiacinas [16], vitamina K₁ [4] y el antimalárico clorquina [50]. En la década

siguiente, otros antimaláricos como plasmocid [22] y primaquina [23], junto con el analgésico ácido acetilsalicílico [24] se determinan sobre soporte sólido, siendo de las pocas aplicaciones que se encuentran en este medio.

Ansiolíticos como loracepan [9] o tiotixeno [51] y antiinflamatorios no esteroides como fenilbutazona [52], también son determinados en medio estacionario. Análogamente, se analizan fármacos antimicrobianos como fleroxacina, en orina, mediante irradiación del complejo que forma con Tb (III) [53], así como lomefloxacina [54] y esparfloxacina [55].

Dos de las familias de principios activos de fármacos que más se han analizado por esta técnica, en disolución, son los antibióticos, en concreto, sulfamidas y antihistamínicos y las fenotiacinas.

Las primeras, mediante fotólisis dan lugar a productos fluorescentes en los que se basa el análisis. Se han propuesto métodos para varias de ellas, tales como sulfametacina, sulfameracina, sulfapiridina y sulfadiacina en diferentes medios [56-61] o bien acoplado PIF a sistemas FIA [57,62].

Por su parte, las fenotiacinas bajo irradiación UV sufren una fotooxidación que origina productos fluorescentes. Se han establecido métodos en estado estacionario [63,64], en presencia de ciclodextrinas [17,65-69] o acoplado a sistemas FIA [28,70].

A partir de los años 80, el acoplamiento HPLC-PIF ha sido ampliamente utilizado en las aplicaciones del campo fármaco-clínico. Entre los múltiples compuestos para los que se han propuesto como métodos de análisis el acoplamiento

PI F con cromatografía líquida de alta resolución podemos citar antiinflamatorios no esteroides [52] como naproxén [71], el estógeno dietilbestrol [72], catecolaminas [10], aminoácidos [73], ácido kinurénico [74], el antiestrógeno tamoxifen [6,7,75], los ansiolíticos clobazán y desmetilclobazán [76,77], los glicósidos cardíacos digoxina y diginatina [78,79], el antituberculoso isoniacida [80] y el estimulante ovulatorio no esteroide clomifeno [81].

G Determinaciones generales

Con relación a las aplicaciones que en esta Memoria hemos denominado "generales", y que están dirigidas al análisis de compuestos no incluidos en los grupos anteriores, aparecen, fundamentalmente, en los años 80, siendo mucho más escasas que las ya citadas.

Así, varios compuestos alifáticos oxigenados [18] son determinados mediante HPLC-PI F en base a reacciones de fotorreducción, con límites de detección muy bajos. Derivados del ácido indólico [82] son determinados mediante derivatización con o-ftalaldehído, en medio sulfúrico, empleando tiempos de irradiación comprendidos entre 4 y 30 minutos y encontrando límites de detección que oscilan entre 2.3 y 110 ng mL⁻¹.

En 1984, Shih y col. [13] estudian los complejos que forman los iones Fe (III), Ni (II), Hg (II) y Co (II) con n-butil-2-naftilmetilditiocarbamato, tanto en medio estacionario como en sistemas en flujo, HPLC. En el primer caso, el tiempo de irradiación está comprendido entre 5 y 10 minutos, mientras que en sistemas en flujo es de 50 a 60 s, con límites de detección inferiores a 1.2 ng mL⁻¹.

Otros compuestos analizados son pupurogalina [8], o difenilamina [83] y un gran número de derivados antraquinónicos e hidrocarburos aromáticos polinucleares con átomos de nitrógeno en su estructura [84] se determinan por fotorreducción con tiempos de irradiación y límites de detección muy bajos.

I.D.5.- BIBLIOGRAFÍA

- [1] Capítulo 3: "Photochemical Fluorometry", J. J. Aaron. En: Molecular Luminescence Spectroscopy. S.G. Schulman (Editor), Chemical Analysis Series, Vol 77 (1993)
- [2] J.M. Fitzgerald, en J.M. Fitzgerald Ed., "Analytical Photochemistry and Photochemical Analysis", New York (1971)
- [3] R.J. Lukasiewicz, J.M. Fitzgerald, Anal. Chem., 45 (1973) 511
- [4] J.J. Aaron, J.E. Villafranca, V.R. White, J.M. Fitzgerald, Appl. Spectrosc., 30 (1976) 159
- [5] J.M. Birks, W. Frei, Trends Anal. Chem., 1 (1982) 361
- [6] R.R. Brown, R. Brain, V. Craig Jordan, J. Chromatogr. Biomed. Appl., 272 (1983) 351
- [7] C. Kikuta, R. Schmid, J. Pharmacol. Biomed. Anal., 7 (1989) 329
- [8] J.J. Aaron, A. Diop, Analisis, 13 (1985) 40
- [9] J.R. Procopio, P.H. Hernández, L.H. Hernández, Analyst, 112 (1987) 79
- [10] Y. Arakawa, K. Imai, Z. Tamura, Anal. Chim. Acta, 147 (1983) 325
- [11] C. de Ruiter, J. F. Bohle, G.J. Dejong, U.A.Th. Brinkman, R.W. Frei, Anal. Chem., 60 (1988) 666
- [12] C.J. Miles, M.A. Moye, I bid, 60 (1988) 220
- [13] Y.T. Shih, P.W. Carr, Anal. Chim. Acta, 159 (1984) 211

- [14] M.D. Gil-García, M. Martínez-Galera, T. López- López, J.L. Martínez-Vidal, M.C. Mahedero, F. Salinas, *Talanta*, 53 (2001) 915
- [15] A. Bautista, J.J. Aaron, M. C. Mahedero, A. Muñoz de la Peña, *Analisis* 27 (1999) 857
- [16] V.R. White, C.S. Frings, J.E. Villafranca, J.M. Fitzgerald, *Anal. Chem.*, 48 (1976) 1314
- [17] M. Maafi, B. Laasis, J.J. Aaron, M.C. Mahedero, A. Muñoz de la Peña, F. Salinas, *J. Includ. Phenom. Mol. Recog. Chem.*, 22 (1995) 235
- [18] M.S. Gandelman, J.W. Birks, *Anal. Chem.*, 54 (1982) 2131
- [19] S. Traore, J.J. Aaron, *Anal. Lett.*, 20 (1987) 1995
- [20] J. Fianza, J.J. Aaron, *Analisis*, 9 (1981) 118
- [21] J.J. Aaron, J. Fianza, *Talanta*, 29 (1982) 383
- [22] J.J. Aaron, J. Fianza, M.D. Gaye, *Ibid*, 30 (1983) 649
- [23] J.J. Aaron, S.A. Ndiaye, J. Fianza, *Analisis*, 10 (1982) 433
- [24] J. Fianza, J.J. Aaron, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 5 (1987) 619
- [25] A.H.M.T. Scholten, U.A Th. Brinkman, R.W. Frei, *Anal. Chim. Acta*, 114 (1980) 137
- [26] A.H.M.T. Scholten, P.L.M. Welling, U.A Th. Brinkman, R.W. Frei, *J. Chromatogr.*, 199 (1980) 239
- [27] C.E. Werkhoven-Goewie, W.M. Boon, A.J.J. Praat, R.W. Frei, U.A. Th. Brinkman, C.L. Little, *Chromatographia*, 16 (1982) 53
- [28] D. Chen, A. Ríos, M.D. Luque de Castro, M. Valcarcel, *Analyst*, 116 (1991) 171
- [29] L.F. García, S. Eremin, J.J. Aaron, *Anal. Lett.*, 29 (1996) 1447
- [30] A. Coly, J.J. Aaron, *Analisis*, 24 (1996) 107
- [31] R.G. Luchtefeld, *J. Chromatogr. Sci.*, 23 (1985) 516
- [32] C.J. Miles, H.A. Moye, *Chromatographia* 24 (1987) 628
- [33] B.M. Patel, H.A. Moye, R. Weinberger, *J. Agric. Food Chem.*, 38 (1990) 126

- [34] B.M. Patel, H.A. Moye, R. Weinberger, *Talanta*, 38 (1991) 913
- [35] C.J. Miles, *J. Chromatogr.*, 592 (1992) 283
- [36] J.A. Stab, M.J.M. Rozing, B. Van Hattum, W.P. Cofino, U.A.Th. Brinkman, *Ibid*, 609 (1992) 195
- [37] A. Muñoz de la Peña, M.C. Mahedero, A. Bautista-Sánchez, *J. Chromatogr. A*. 950 (2002) 287
- [38] A. Coly, J.J. Aaron, *Analyst*, 119 (1994) 1205
- [39] S. Eremin, B. Laasis, J.J. Aaron, *Talanta*, 43 (1996) 295
- [40] J.J. Aaron, A. Coly, *Analyst*, 121 (1996) 1545
- [41] A. Coly, J.J. Aaron, *Talanta*, 49 (1999) 107
- [42] A. Coly, J.J. Aaron, *Luminescence*, 15 (2000) 63
- [43] M. Maafi, K. Taha-Bouamri, A. Bautista, J.J. Aaron, M.C. Mahedero, A. Muñoz de la Peña, F. Salinas, *Biomed. Chromatogr.*, 13 (1999) 189
- [44] A.M. García Campaña, J.J. Aaron, *Luminescence*, 15 (2000) 110
- [45] A. Coly, J.J. Aaron, *Anal. Chim. Acta*, 360 (1998) 129
- [46] M.C. Mahedero, A. Muñoz de la Peña, A. Bautista-Sánchez, J.J. Aaron, *Luminescence*, 15 (2000) 103
- [47] M.C. Mahedero, A. Muñoz de la Peña, A. Bautista-Sánchez, J.J. Aaron, *J. Incl. Phenon. Mol. Recog.*, (2001), (en prensa)
- [48] A. Coly, J.J. Aaron, *Anal. Chim. Acta*, 392 (1999) 255
- [49] A.M. García-Campaña, J.J. Aaron, J.M. Bosque-Sendra, *Talanta*, 55 (2001) 531
- [50] R.J. Lukasiewicz, J.M. Fitzgerald, *Appl. Spectrosc.*, 28 (1974) 151
- [51] W.P. Cai, Y.G. Ouyang, J.M. Chen, G.Q. Tang, *Fenxi Huaxue*, 25 (1997) 519
- [52] R. Fricoteaux, M. Quaglia, J.J. Aaron, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 7 (1989) 1585
- [53] Y. Wu, T.L. Zhang, H.C. Zhao, L.P. Jin, *Anal. Lett.*, 33 (2000) 3303
- [54] T.L. Zhang, H.C. Zhao, L.P. Jin, *Talanta* 49 (1999) 77
- [55] F.T. You, T.L. Zhang, L.P. Jin, H.C. Zao, S.B. Wang, *Spectrochim. Acta*, 55 A

(1999) 1119

[56] M.C. Mahedero, J.J. Aaron, *Analisis*, 20 (1992) 53

[57] M. Sánchez-Peña, F. Salinas, M.C. Mahedero, J.J. Aaron, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 10 (1992) 805

[58] M. Sánchez-Peña, F. Salinas, M.C. Mahedero, J.J. Aaron, *Talanta*, 41 (1994) 233

[59] M. Sánchez-Peña, A. Muñoz de la Peña, F. Salinas, M.C. Mahedero, J.J. Aaron, *Analyst*, 119 (1994) 1177

[60] M.C. Mahedero, F. Salinas, M. Jiménez Arrabal, J.J. Aaron, *Anal. Lett.*, 27 (1994) 1543

[61] J.J. Aaron, M.I. Acedo Valenzuela, M. Sánchez-Peña, F. Salinas, M.C. Mahedero, *Anal. Chim. Acta*, 314 (1995) 45

[62] M.C. Mahedero, J.J. Aaron, *Ibid*, 269 (1992) 193

[63] B. Laassis, J.J. Aaron, M.C. Mahedero, *Ibid*, 290 (1994) 27

[64] B. Laassis, M. Maafi, J.J. Aaron, M.C. Mahedero, *Anal. Lett.*, 30 (1997) 1541

[65] J.J. Aaron, B. Laassis, M.C. Mahedero, A. Muñoz de la Peña, F. Salinas, *J. Incl. Mol. Recog. Chem.*, 18 (1994) 69

[66] M. Maafi, B. Laassis, J.J. Aaron, M.C. Mahedero, A. Muñoz de la Peña, F. Salinas, *J. Fluorescence*, 7 (1997) 25

[67] M. Maafi, J.J. Aaron, M.C. Mahedero, F. Salinas, *J. Fluorescence*, 7 (1997) 11

[68] M. Maafi, M.C. Mahedero, J.J. Aaron, *Talanta*, 44 (1997) 2193

[69] M. Maafi, J.J. Aaron, M.C. Mahedero, F. Salinas, *Appl. Spectrosc.*, 52 (1998) 91

[70] B. Laassis, J.J. Aaron, M.C. Mahedero, *Talanta*, 41 (1994) 1985

[71] D. Westerlund, A. Theodorsen, Y. Jaksch, *J. Liq. Chromatogr.*, 2 (1979) 969

[72] A.T. Rhys-Williams, S.A. Winfield, R.C. Belloli, *J. Chromatogr.*, 235 (1982) 461

[73] K. Imai, E. Ueda, T. Toyo'oka, *Anal. Chim. Acta*, 205 (1988) 7

[74] K. Matawari, *Bunseki-Kagaku*, 44 (1995) 165

- [75] M. Nieder, H. Jaeger, *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, 57 (1987) 207
- [76] M. Uihlein, E. Schwab, *Chromatographia*, 15 (1982) 140
- [77] U.A.Th. Brinkman, P.L.M. Welling, G. De Vries, A.H.M.T. Scholten, R.W.Frei, *J. Chromatogr.*, 217 (1981) 463
- [78] M.S. Gandelman, J.W. Birks, U.A.Th. Brinkman, R.W. Frei, *Ibid*, 282 (1993) 193
- [79] M.S. Gandelman, J.W. Birks, *Anal. Chim. Acta*, 155 (1983) 159
- [80] K. Mawatari, F. Inuma, M. Watanabe, *Anal. Sci.*, 6 (1990) 515
- [81] I. Urmos, S.M. Benko, I. Klebovich, *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, 128 (1993) 168
- [82] T.C.M. Pastore, M. Nicola, C.G. de Lima, *Analyst*, 109 (1984) 243
- [83] C.A.T. Fall, A. Diop, J.J. Aaron, *Bull. Soc. Chim. Belg.*, 95 (1986) 631
- [84] J.R. Poulsen, J.W. Birks, *Anal. Chem.*, 61 (1989) 2267

II. REACTIVOS APARATOS Y PROGRAMAS

II.1.- DISOLUCIONES Y REACTIVOS

II.1.1.- Disoluciones

II.1.2.- Disolventes

II.1.3.- Reactivos

II.2.- INSTRUMENTACIÓN

II.3.- PROGRAMAS INFORMÁTICOS

II.4.- BIBLIOGRAFÍA

II.1.- DISOLUCIONES Y REACTIVOS

Para la elaboración de esta Memoria se han empleado las siguientes disoluciones, disolventes y reactivos.

II.1.1.- Disoluciones

a) Disoluciones de fitohormonas

- Disolución de ácido naftilacético (NAA) 1.0×10^{-2} M.- Se preparó una disolución madre 1.0×10^{-2} M en etanol absoluto pesando 0.188 g y diluyendo hasta 100.00 mL. A partir de esta disolución, se prepararon, por dilución exacta, las siguientes disoluciones:

- Disolución acuosa 1.0×10^{-4} M.- Se toma una alícuota de 1.00 mL de la disolución madre, se lleva a un matraz y se elimina el etanol pasando N_2 . Se añade agua hasta 100.00 mL. Se prepararon soluciones 1.0×10^{-5} M por dilución exacta de ésta con agua ultrapura.

- Disolución etanólica 1.0×10^{-4} M (1% en etanol).- Se toma 1.00 mL de la disolución madre y se lleva a un matraz de 100.00 mL con agua ultrapura. Soluciones 1.0×10^{-5} M se prepararon por dilución exacta de ésta.

- Disolución de 1-naftalenacetamida (NAAM) 1.0×10^{-4} y 5.0×10^{-4} .- Se prepararon disoluciones madres 1.0×10^{-4} y 5.0×10^{-4} M en agua ultrapura, pesando 1.0 y 4.8 mg, respectivamente y diluyendo hasta 50.00 mL. Para su total disolución fue necesario llevar al baño de ultrasonido. Disoluciones 1.0×10^{-5} y 5.0×10^{-5} M se prepararon por dilución exacta de éstas con agua ultrapura.

b) Disoluciones de herbicidas

Se prepararon disoluciones madre 5.0×10^{-3} M en 2-propanol, pesando 0.012 g de Diurón, 0.010 g I soproturón, 0.013 g de Linurón y 0.014 g de Neburón diluyendo hasta 10.00 mL con 2-propanol. Para su total disolución fue necesario emplear el baño de ultrasonido.

A partir de estas disoluciones madre se prepararon disoluciones 5.0×10^{-5} M acuosas tomando alícuotas de 0.1 mL de las disoluciones madre y llevándolas a un matraz al que se añade agua ultrapura hasta 10.00 mL.

Disoluciones 1.0×10^{-4} y 4.0×10^{-4} M se prepararon por dilución exacta de la disolución madre con agua ultrapura. Todas ellas contienen menos del 1 % (v/v) de 2-propanol.

Para los estudios y métodos cromatográficos, se prepararon disoluciones madre de 400 g mL^{-1} , de cada uno de los herbicidas, en un volumen final de 10.00 mL, por pesada de 0.004 g. Disoluciones de menor concentración fueron preparadas a partir de ésta, por dilución exacta. El disolvente en el que se preparó fue acetonitrilo o 2-propanol.

Todas las disoluciones madre se conservaron en el congelador siendo preparadas de nuevo transcurrido un mes desde su preparación.

c) Disoluciones de ciclodextrinas

Para la completa solubilización de las ciclodextrinas fue necesario mantener las disoluciones en el baño de ultrasonido hasta su total disolución.

\$-CD.- Se emplearon disoluciones madre de 1.25×10^{-2} , 1.2×10^{-2} y 1.0×10^{-2} M, en agua, por pesada de 1.42, 1.36 y 1.14 g, respectivamente, en 100.00 mL.

HP-\$-CD.- Se empleó una disolución madre de 2.0×10^{-2} M en agua, por pesada de 2.6 g en 100.00 mL.

d) Disoluciones tampón

En la parte de la Memoria realizada en la Universidad París VII, sección III.B.3, se utilizaron disoluciones tampón de pH ya preparados, pH 2, 5, 7 y 9, obtenidas de Acros Organic, Fluka y Merck.

También se preparan disoluciones tampón de pH 4, 5, 7 y 9.

- Disoluciones tampón de pH = 4 y 5.- Se pesan 20.50 de acetato sódico y se introducen en un matraz aforado de 500 mL con agua ultrapura. A continuación, se añade acético glacial hasta conseguir los pH deseados. La concentración de las disoluciones tampón son de 0.50 M.

- Disolución tampón de pH = 7.- Se toman 50 mL de KH_2PO_4 0.2 M, se le añaden 29.1 mL de KOH 0.2 M y se lleva a un matraz aforado de 100 mL. La concentración de la disolución es de 0.1 M.

- Disolución tampón de pH = 9.6.- Se transfieren 13.37 g de cloruro amónico a un matraz aforado de 500 mL y se añade amoniaco hasta conseguir el pH deseado. La concentración de la disolución reguladora es de 0.5 M

e) Disoluciones de surfactantes

Como medios micelares se emplearon cloruro de cetiltrimetilamonio, CTAC, al 25 % (v/v), en agua, y dodecilsulfato sódico, SDS. Se preparan disoluciones madre 0.01 M y 0.1 M en CTAC y SDS, respectivamente, con agua ultrapura.

Posteriormente, se toman alícuotas de estas disoluciones de modo que se superen las c.m.c de ambos:

$$\text{cmc}_{\text{CTAC}}: 1.3 \times 10^{-3} \text{ M}$$

$$\text{cmc}_{\text{SDS}}: 8.6 \times 10^{-3} \text{ M}$$

Se prepararon disoluciones micelares de los herbicidas introduciendo 25 ó 50 : L de las disoluciones madre propanólicas de éstos en un matraz aforado de 5 mL, añadiendo a continuación, 1.00 mL de disolución tampón, disolución micelar y ajustando hasta enrase con agua ultrapura. Todas las disoluciones contenían menos de un 1% (v/v) de 2-propanol.

f) Disolución de sulfito sódico

Se utilizaron varias disoluciones de sulfito sódico de distintas concentraciones preparadas por pesada de la cantidad adecuada de Na_2SO_3 y dilución hasta 50.00 mL con agua ultrapura. Estas soluciones fueron utilizadas siempre recién preparadas.

II.1.2.- Disolventes

Los disolventes fueron obtenidos de las siguientes casas comerciales:

g Merck

Acetonitrilo, etanol, metanol y 2-propanol.

g Panreac

Ácido acético, amoniaco y 2-propanol

II.1.3.- Reactivos

Los reactivos empleados fueron adquiridos en las casas comerciales que a continuación se indican:

g Acros Organic

SDS, 99%.

g Aldrich

Ácido 1-naftilacético, 99 %; CTAC, 25%, wt; 1,2-dibromoetano, 99 % ;

2-bromoetanol, 95 %; 1,2-dibromoetano, 99 %;- 2,3-dibromopropanol, 96 %.

g Chem Service

1-naftilacetamida, 96 %; 2,4,5-T,99.5 %; Propanil, 98 %.

g Ciclobab

β-ciclodextrina; hidroxipropil-β-ciclodextrina.

g Merck

Sulfito sódico; fosfato potásico; hidróxido potásico.

g Panreac

Acetato sódico; cloruro amónico.

g Sigma

Diurón, 98 %; 2,4-D, 99 %; MCPA, 99 %;1,3-dibromopropano, 98 %;

g Riedel-de Hæn

I soproturon, 99 %; Diurón, 99 %; Neburón, 99 %; Linurón, 99 %; MCPP, 99 %.

Los reactivos y disolventes empleados fueron calidad reactivo análisis.

II.2.- INSTRUMENTACIÓN

U Para el registro de los espectros de excitación y emisión, así como para las medidas de intensidad de fluorescencia, se ha empleado un espectrofotómetro de luminiscencia SLM Aminco Bowman Series 2, equipado con dos lámparas de descarga de xenon, una continua de 150 W y otra de pulsos de 7 W (duración del pulso, aproximadamente 12 : s). El instrumento está conectado mediante una tarjeta GPI B (IEE-488) a un microprocesador PC-386. La adquisición de datos y el análisis de los mismos fueron realizados con el paquete de software AB2 versión 1.40, bajo el sistema operativo OS/2 2.0.

Con este instrumento, y dado que viene equipado de una lámpara de xenon pulsada, se pueden realizar medidas de fluorescencia y fosforescencia. Después de un pulso inicial de energía de la lámpara, con una duración t_p , la señal de fosforescencia alcanza un valor máximo y después decae exponencialmente. A un

tiempo dado, tiempo de espera o "delay time", t_d , una vez que el flash de la fuente ha decaído sustancialmente, el fotomultiplicador se enciende y la señal de fosforescencia se recoge e integra durante un tiempo denominado tiempo de integración o "gate time", t_g . El detector fotomultiplicador es entonces apagado y la secuencia se repite. Si el t_d es mayor de 0.1 ms el detector no mide ninguna señal de fluorescencia.

El espectrofotómetro de luminiscencia fue calibrado utilizando la barra patrón de fluorescencia nº 6 de Perkin-Elmer, equivalente a una disolución de Rodamina B de concentración 3×10^{-4} M a una temperatura de 20°C, con longitud de onda de excitación 480 nm y longitud de onda de emisión 580 nm.

U Espectrofluorímetro Perkin Elmer LS-5, con un tiempo de respuesta de 4 s y un ancho de banda de 10 nm, controlado por un ordenador Geocom. Acoplado al fluorímetro se empleó un baño termostático Landa Model K4R con el fin de fijar la temperatura a 20° C.

U Para llevar a cabo la fotólisis de los herbicidas se empleó una lámpara de mercurio de alta presión HBO Osram 200W, modelo Oriol 8500, cuyo diseño se muestra en la Figura II.1.



Figura II.1.- Esquema de la lámpara de Hg.

U Todas las medidas se realizaron utilizando cubetas de cuarzo Hellma-Hispania de 1 cm de espesor y con una capacidad aproximada de 4 mL. Éstas poseen tapones que permiten el paso de N₂ para realizar estudios anaeróbicos. El portacubetas se termostatóizó mediante circulación continua de agua a 20 °C.

U Espectrofotómetro UV-visible Milton Roy Spectronic 3000 array, con cubetas de cuarzo de 1cm de espesor. Está controlado por un ordenador Olivetti PC 286. La adquisición y análisis de los espectros de absorción se realizó utilizando el paquete software de Beckman Data Leader versión 3.0.

U Ultratermostato Selecta Mod. Frigiterm, capaz de regular la temperatura entre -10°C y 100°C, con una precisión de ± 0.1°C. Para emplear dicho equipo, éste se conectó al soporte de la cubeta del espectrofluorímetro, para mantener la temperatura de la misma en 20° C.

U pHmetro "Crison" modelo 501, provisto de electrodo combinado de vidrio y de calomelanos saturado Metrohm EA120 y de microelectrodo combinado Crison.

U Todas las pesadas se llevaron a cabo en una balanza Ohaus con una sensibilidad de ± 0.1 mg.

U Baño de ultrasonidos, P. Selecta.

U Microscopio Nikon EPI PHOT 300, para realizar el estudio de los cristales formados en disolución.

U Cromatógrafo Waters 600E, equipado con una bomba Waters 610 y dos detectores, uno, UV-Visible, Model 486 y otro fluorescente, Model 474. El sistema está equipado con una válvula de seis vías, Rheodyne, bucle de 20 : L y columna Nova-Pak C₁₈, de dimensiones 15 cm x 3.9 mm de diámetro interno. La reacción fotoquímica se llevó a cabo con un fotorreactor post-columna.

En la Figura II.2 se muestra un esquema del montaje correspondiente al sistema HPLC-fotorreactor.

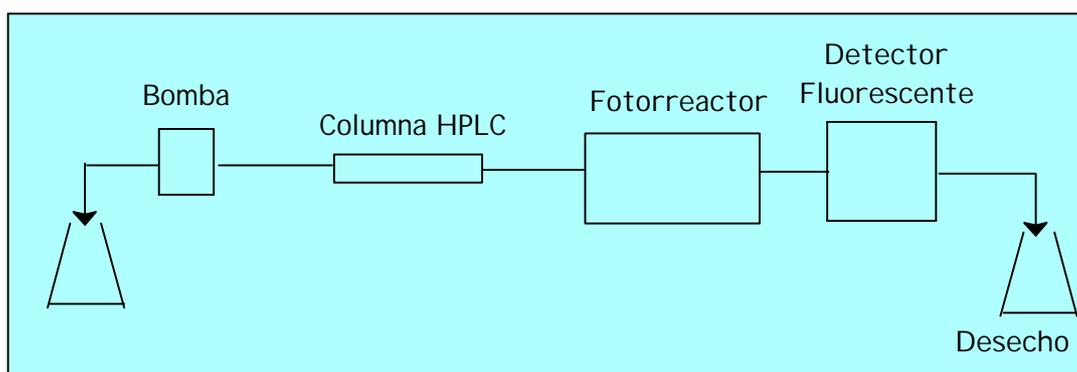


Figura II.2.- Esquema del montaje HPLC-fotorreactor

El fotorreactor (Softron GmbH, Gynkotek HPLC, Germening, Germany) consta de una carcasa que protege la lámpara de xenon de 4 W que emite a 254 nm y alrededor de la cual va entretejida una malla de teflón (5m x 1.6 mm DE x 0.3 mm DI). También va provisto de un ventilador que evita el calentamiento, tanto del teflón como de la disolución que circula a su través. Un esquema del interior del fotorreactor es el que se muestra en la Figura II.3.

El equipo está controlado por un ordenador PC 386. La adquisición y tratamiento de datos se realiza mediante el programa Maxima 825, versión 3, bajo el sistema operativo MS DOS.

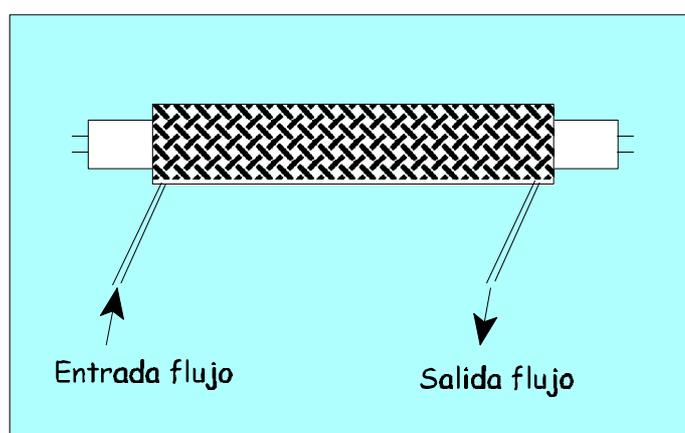


Figura II.3.- Esquema del interior del fotorreactor.

II.3.- PROGRAMAS INFORMÁTICOS

Los programas informáticos empleados para determinar los parámetros de fiabilidad de los métodos propuestos y analizar el cumplimiento de la adición patrón fueron:

g Alamín 1.0 [1].

g Quimio [2].

También se utilizaron los siguientes programas:

g Corel WordPerfect, versión 8.0.

g SlideWrite Plus for Windows, versión 1.10.

g NLR [3].

g Grapher for Windows, versión 1.32.

g ChemWindows3, versión 3.0.2.

g HyperChem Pro for Windows, Versión 5.1.

II.4.- BIBLIOGRAFÍA

[1] A.M. García-Campaña, L. Cuadros Rodríguez, F. Alés Barrero, M. Román Ceba, Trac-Trends Anal. Chem., 16 (1997) 381

[2] "Avances en Quimiometría Práctica". Coordinador: Dr. R. Cela. Autores: Dr. M. Blanco, Dr. R. Boqué, Dr. R. Cela, Dr. J. Coello, Dr. S. Maspoch, Dra. M^a C. Ortíz, Dr. J. Ribo, Dr. F.X. Rius, Dr. A. Ruiz, Dr. L.A. Sarabia, Dr. X. Tomás. Universidad de Santiago de Compostela (1994)

[3] SAS/STAT, Release 6.03; SAS Institute Inc., Cary, NY, 1988

III.A.- ESTUDIO ESPECTROFLUORIMÉTRICO Y FOSFORIMÉTRICO DE LOS COMPLEJOS DE INCLUSIÓN QUE FORMA EL ÁCIDO 1-NAFTILACÉTICO Y LA NAFTALENACETAMIDA CON β -CD Y 1,3 DIBROMOPROPANO

III.A.1.- ESTUDIOS ESPECTROFLUORIMÉTRICOS

III.A.1.1.- Espectros de excitación y emisión

III.A.1.2.- Estabilidad de las disoluciones

III.A.1.3.- Influencia del contenido de 1,3 -dibromopropano

III.A.1.4.- Influencia del tiempo de agitación

III.A.1.5.- Influencia del contenido de 1,3 -dibromopropano, en presencia de β -ciclodextrina

III.A.2.- ESTUDIOS FOSFORIMÉTRICOS.- OBTENCIÓN DE RTP.

III.A.2.1.- Espectros de emisión de los complejos ternarios formados

III.A.2.2.- Influencia del tiempo de medida

III.A.2.3.- Influencia del contenido de sulfito sódico

III.A.2.4.- Influencia del tiempo de agitación

III.A.2.5.- Influencia del paso de nitrógeno

III.A.2.6.- Influencia del contenido de 1,3-dibromopropano

III.A.2.7.- Influencia de la concentración de β -ciclodextrina

III.A.2.8.- Rectas de calibrado

III.A.2.8.1.- Ecuación de la recta de calibrado y parámetros estadísticos

III.A.2.8.2.- Parámetros de fiabilidad

III.A.2.8.3.- Método operatorio

III.A.3.- INFLUENCIA DEL TIPO DE ÁTOMO PESADO EN LA SEÑAL DE RTP.

III.A.4.- ESTUDIO MICROSCÓPICO Y MODELACIÓN MOLECULAR DE LOS COMPLEJOS DE INCLUSIÓN

III.A.4.1.- Estudio microscópico

III.A.4.1.- Estudio mediante modelación

III.A.4.1.- Discusión

III.A.5.- BIBLIOGRAFÍA

Este trabajo ha dado lugar a dos comunicaciones presentadas a congresos y a dos artículos:

g Congreso: "X Reunión de la Sociedad Española de Química Analítica", Almería, España (1997). Título: "Determinación fosforimétrica de ácido 1-naftilacético mediante inclusión en β -CD en presencia de 1,3-dibromopropano". Autores: A. Muñoz de la Peña, M. C. Mahedero, F. Salinas, A. Bautista-Sánchez. Comunicación: C-E05

g Congreso: " Second Mediterranean Basin Conference on Analytical Chemistry", Rabat, Marruecos (1997). Título: "Room temperature phosphorimetric determination of 1-naphthalen-acetamide by β -cyclodextrin inclusion in presence of 1,3-dibromopropane". Autores: A. Bautista-Sánchez, A. Muñoz de la Peña, M. C. Mahedero, F. Salinas, A. Espinosa-Mansilla. Comunicación: PI I -83

g "Room temperature phosphorescence of 1-naphthalenacetamide included in β -cyclodextrin in presence of 1,3-dibromopropane", A. Muñoz de la Peña, M. C. Mahedero García, A. Espinosa-Mansilla, A. Bautista Sánchez, M. Reta, Talanta, 48 (1999) 15-21

g "Host-guest room temperature phosphorescence of 1-naphthalenacetic acid included in β -cyclodextrin in presence of 1,3-dibromopropane", A. Muñoz de la Peña, M. C. Mahedero, A. Bautista-Sánchez, Anal. Lett. 34 (2001) 2391-2401

III.A.- ESTUDIO ESPECTROFLUORIMÉTRICO Y FOSFORIMÉTRICO DE LOS COMPLEJOS DE INCLUSIÓN QUE FORMA EL ÁCIDO 1-NAFTILACÉTICO Y LA NAFTALENACETAMIDA CON β -CD Y 1,3 DIBROMOPROPANO

Los dos compuestos en estudio son empleados para la eliminación del sobrante de flores o frutos que al competir por los nutrientes, producirían frutos pequeños que no serían interesantes comercialmente. Con estas fitohormonas se tratan diferentes variedades de manzanos y perales y en menor medida uvas.

III.A.1.- ESTUDIOS ESPECTROFLUORIMÉTRICOS

III.A.1.1.- Espectros de excitación y emisión

Se procedió inicialmente al establecimiento de los espectros de excitación y emisión. Ambos se registraron utilizando disoluciones acuosas 1.0×10^{-5} M de ácido naftilacético (NAA) y naftalenacetamida (NAAM), partiendo de los datos que se tenían de la bibliografía [1,2]. En la Tabla III.A.1 se recogen las longitudes de onda de máxima señal obtenidas para cada compuesto.

Tabla III.A.1.- Longitudes de onda de excitación y emisión de NAA y NAAM.

Compuesto	λ_{exc} (nm)	λ_{em} (nm)
NAA	282	326 y 336
NAAM	226 y 282	325 y 338

Dichos espectros se encuentran representados en la Figura III.A.1. En ambos casos nos encontramos con dos máximos de emisión cuando se excita a 282 nm, pero sólo NAAM tiene dos máximos de excitación, cuando se fija la emisión en la longitud de onda mayor, 338 nm.

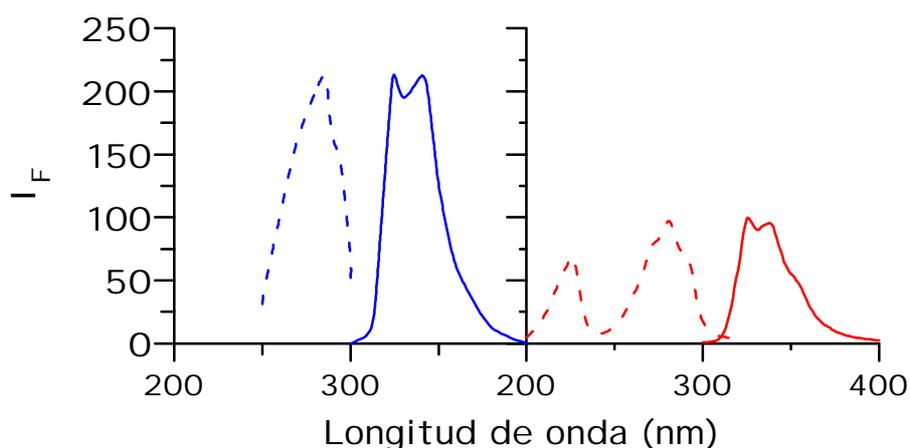


Figura III.A.1.- Espectros de excitación (- - -) y emisión (—) de NAA y NAAM en agua.

Elegimos como máximos de emisión el de mayor longitud de onda de cada compuesto y como máximo de excitación 282 nm, en ambos casos.

III.A.1.2.- Estabilidad en agua de las disoluciones

Con el fin de establecer la estabilidad de NAA y NAAM se toman disoluciones acuosas 1.0×10^{-5} M, preparadas a partir de las correspondientes disoluciones madre 1.0×10^{-4} M. En ambos casos se estudia la evolución de la señal de fluorescencia con el tiempo. Para NAA, también se comprueba la estabilidad de las disoluciones que contienen un 0.1% de etanol, cuando las disoluciones madre están preparadas en medio etanólico.

Se registran los espectros de emisión fijando la longitud de onda de excitación en 282 nm. Los resultados obtenidos, a la longitud de onda de emisión de cada compuesto, se encuentran representados en la Figura III.A.2.

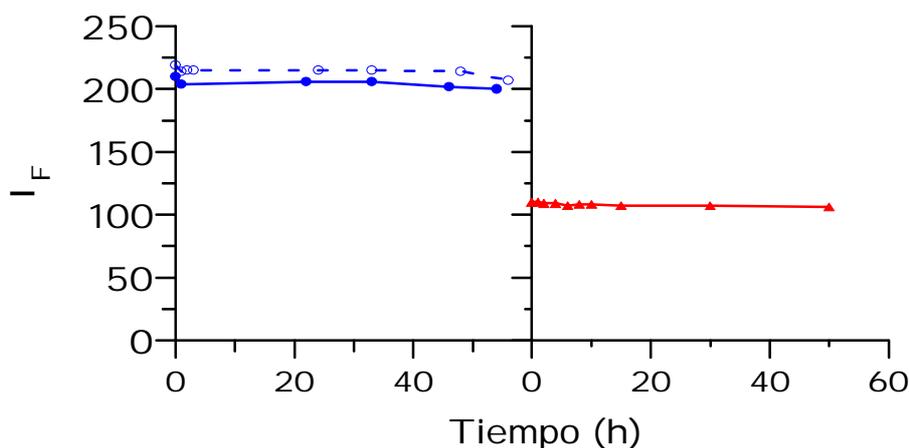


Figura III.A.2.- Estabilidad de las disoluciones de NAA, en medio hidroalcohólico (▲), en medio acuoso (●) y de NAAM (▲).

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto una adecuada estabilidad del NAA tanto en medio acuoso como hidroalcohólico, al menos durante 48 horas. A partir de este tiempo se observa en ambos casos una ligera disminución de la intensidad de fluorescencia. En el caso de NAAM, se estudió, además, la estabilidad a lo largo de los días comprobándose que las disoluciones permanecían prácticamente estables durante más de 15 días.

Para experiencias posteriores las disoluciones de NAA serán preparadas cada dos días, evitando así posibles problemas derivados de la estabilidad. En cuanto a las disoluciones de NAAM serán preparadas cada 15 días.

III.A.1.3.- Influencia del contenido de 1,3-dibromopropano

Para estudiar la influencia del contenido de 1,3-dibromopropano (1,3-DBP) en la señal de fluorescencia, se prepararon muestras en matraces de 10.00 mL, manteniendo constante en todos ellos una concentración de analito de 1.0×10^{-5} M y contenidos crecientes de 1,3-DBP.

La señal de fluorescencia de cada muestra fue medida frente a un blanco preparado en las mismas condiciones, pero en ausencia del compuesto correspondiente. En la Figura III.A.3 se recogen los resultados obtenidos, observándose que en medio hidroetanolico la intensidad de fluorescencia disminuye hasta que el porcentaje de 1,3-DBP es de 0.5%. Para contenidos comprendidos entre el 0.5 y 2.0% se mantiene prácticamente constante, disminuyendo ligeramente para contenidos superiores al 2.0%.

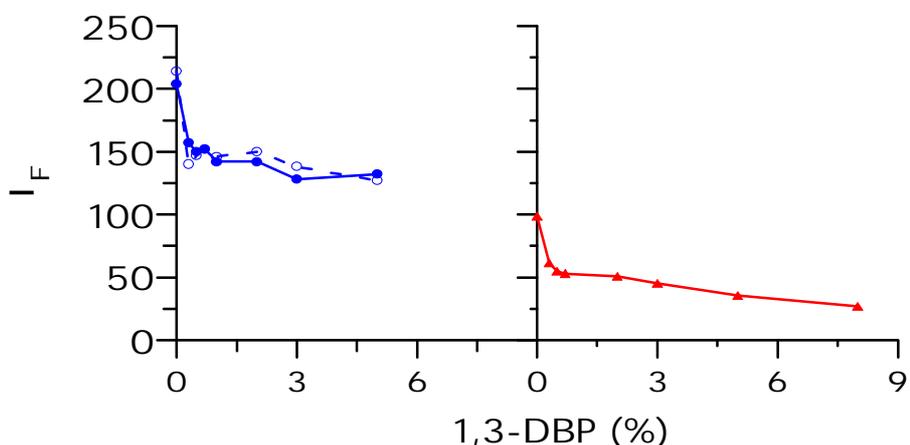


Figura III.A.3.- Influencia del contenido de 1,3-DBP en la señal de fluorescencia de NAA, en medio hidroalcohólico (□), en medio acuoso (!) y de NAAM (•).

En medio acuoso, en el caso de NAA, la intensidad de fluorescencia disminuye a medida que aumenta el contenido de 1,3-DBP hasta que se llega al 1.0% , a partir del cual permanece prácticamente constante. En lo que a NAAM se refiere, la intensidad de fluorescencia disminuye drásticamente hasta que el porcentaje de 1,3-DBP es de 0.7%. Para porcentajes superiores disminuyen progresivamente a medida que aumenta el contenido de 1,3-DBP.

Para experiencias posteriores se empleará un contenido en bromoalcano del 2.0 %, para NAA y 3.0 % para NAAM.

III.A.1.4.- Influencia del tiempo de agitación

Con el fin de estudiar la influencia que tiene el tiempo de agitación en la señal de fluorescencia se preparan muestras en matraces de 10.00 mL, en los que se introducen 1.00 mL de la disolución acuosa del analito, 1.0×10^{-4} M y 0.20 mL de 1,3-DBP, en el caso de NAA y 0.30 mL, cuando sea NAAM.

Los resultados obtenidos para NAA, representados en la Figura III.A.4, muestran un ligero aumento de la señal hasta los 4 minutos de agitación, permaneciendo prácticamente constante cuando se agita durante tiempos comprendidos entre 4 y 7 minutos. Para un tiempo de agitación superior a 7 minutos, la señal de fluorescencia disminuye. Con NAAM, encontramos una señal máxima cuando se agita la disolución durante 3 minutos. Para tiempos superiores, la señal de fluorescencia comienza a disminuir ligeramente.

En experiencias posteriores se emplean 5 minutos, para NAA y 2 minutos, para NAAM, como tiempos de agitación.

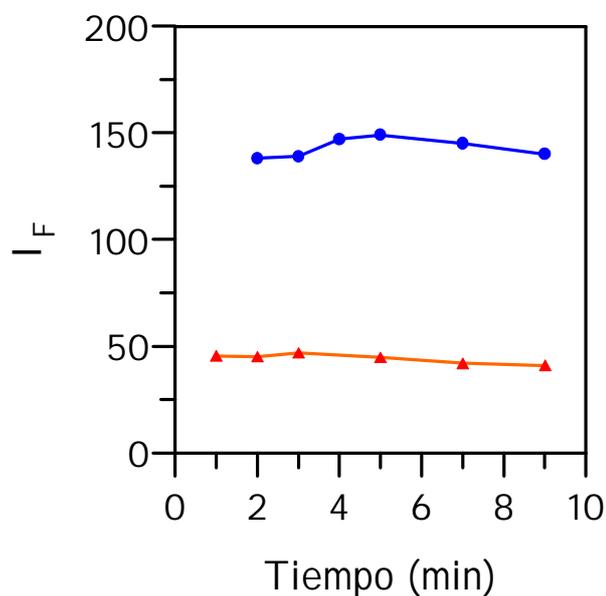


Figura III.A.4. - Influencia del tiempo de agitación en disoluciones de NAA (●) y NAAM (▲).

III.A.1.5. - Influencia del contenido de 1,3-DBP, en presencia de \$-CD

El estudio de la influencia de la presencia de 1,3-DBP en la señal de fluorescencia de los complejos de inclusión analito:\$-CD, se llevó a cabo en medio acuoso y en medio hidroetanólico (0.1 % de etanol), para NAA y sólo en medio acuoso para NAAM. En ambas experiencias, se mantuvieron constantes las concentraciones finales de NAA, 1.0×10^{-5} M, y de \$-CD, 5.0×10^{-3} M, aumentándose de forma creciente el contenido de bromoalcano. También se prepararon los correspondientes blancos, exentos de pesticida.

Registrados los espectros de emisión, empleando 282 nm como longitud de onda de excitación, se observó que tanto en medio acuoso como en medio hidroetanólico, la presencia de \$-CD no produce desplazamiento en el máximo de

emisión. Los resultados obtenidos se representan en la Figura III.A.5.

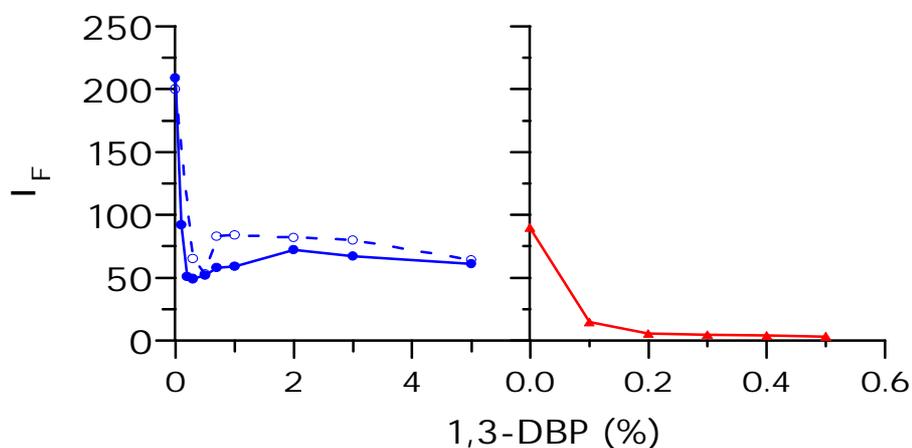


Figura III.A.5.- Intensidad de fluorescencia del complejo formado en función del contenido en 1,3-DBP, en disoluciones de NAA, en medio hidroalcohólico (○), en medio acuoso (●) y de NAAM (●).

Los resultados obtenidos muestran que en ambos medios la presencia de 1,3-DBP origina una disminución muy brusca de la señal de fluorescencia, conduciendo a la casi desaparición de la señal, en el caso de NAAM, incluso con contenidos de bromoalcano inferiores al 0.3%.

En el caso de NAA, en medio hidroetanólico se origina un aumento de la señal de fluorescencia para contenidos de 1,3-DBP comprendidos entre 0.5 y 1.0 %, a partir del cual la señal disminuye muy lentamente a medida que aumenta el porcentaje de 1,3-DBP. En medio acuoso el comportamiento inicial es similar, aunque el aumento de la señal, que en este medio tiene lugar entre 0.5 y 2.0 % de bromoalcano, es menos importante que en medio hidroetanólico. A la vista de estos resultados, se opta por trabajar en medio acuoso en posteriores experiencias.

Se concluye que la acción de 1,3-DBP sobre la emisión de fluorescencia es mucho más acusada en presencia de β -CD, que en su ausencia, lo que indica una mayor interacción de los átomos pesados del bromoalcano con el analito al formarse un complejo ternario de inclusión.

Una vez realizado el estudio de la influencia del contenido de 1,3-DBP en presencia de β -CD, introducida por adición de 5.00 mL de una disolución 1.0×10^{-2} M, se plantearon dos experiencias, empleando como analito NAA, con el fin de comprobar si la concentración, así como la forma de adición de la ciclodextrina influía de manera considerable en la señal de fluorescencia.

En una de ellas se mantuvo una concentración de β -CD de 5.0×10^{-3} M por adición de 0.057 g del producto sólido. En la otra, la concentración fue de 1.0×10^{-2} M por adición de 0.114 g de β -CD sólida y en ambas se fue variando de forma creciente el contenido en 1,3-DBP.

En la Figura III.A.6 se muestran los resultados obtenidos, los cuales ponen de manifiesto que añadir la β -CD sólida, para conseguir una concentración final de 5.0×10^{-3} M, conduce a resultados similares a los descritos en la experiencia anterior, cuando la ciclodextrina se añade en disolución.

Cuando la concentración de ciclodextrina es de 1.0×10^{-2} M, al añadir a la disolución 1,3-DBP la disminución de la fluorescencia es más acusada que en el caso anterior, Figura III.A.6.A. Ello significa que cuanto mayor es la concentración de β -CD, mayor es la pérdida de fluorescencia, en presencia de bromoalcano.

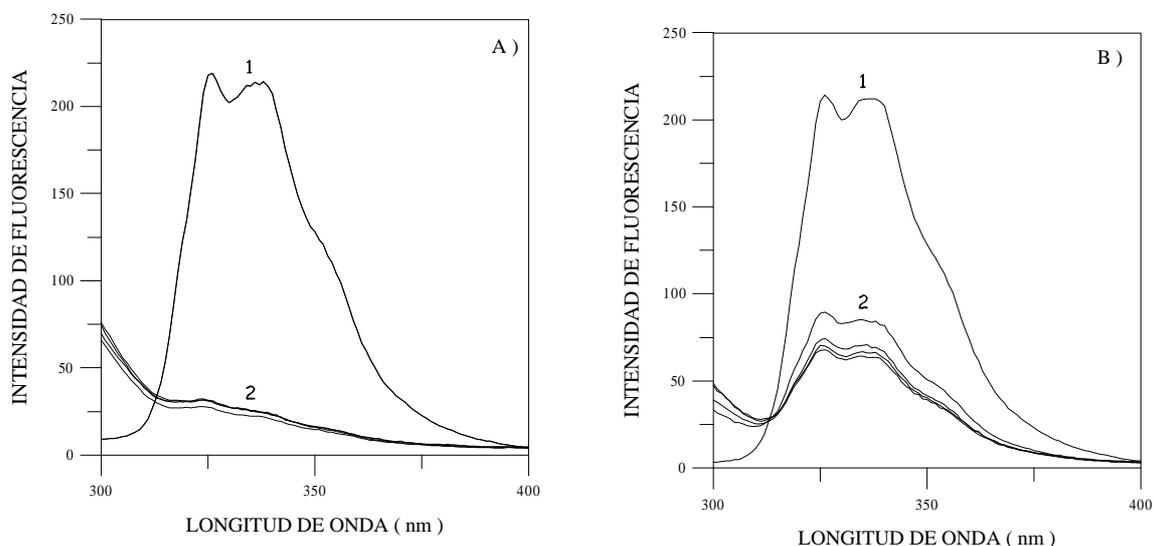


Figura III.A.6. - Influencia del contenido de 1,3-DBP en presencia de β -CD sólida. A) Concentración final de β -CD 1.0×10^{-2} M.

B) Concentración final de β -CD 5.0×10^{-3} M.

1) Ausencia de alcano.

2) Presencia de alcano.

Por otra parte, hay que señalar que en ambas series de matraces, cada muestra requiere estar en el baño de ultrasonido 30 minutos para la total disolución de la β -CD, lo que implica una preparación excesivamente tediosa. Por ello, se decide añadir la ciclodextrina en disolución para no alargar excesivamente el método que se pone a punto.

III.A.2.- ESTUDIOS FOSFORIMÉTRICOS.- OBTENCIÓN DE RTP**III.A.2.1.- Espectro de emisión de fosforescencia a temperatura ambiente de los complejos NAA:\$-CD:1,3-DBP y NAAM:\$-CD:1,3-DBP**

Inicialmente se procedió a registrar los espectros de emisión de fosforescencia a temperatura ambiente del ácido naftilacético y de la naftalenacetamida.

Se registró el espectro de una muestra de NAA preparada en un tubo desechable de 5.00 mL que contenía 15 : L de disolución 1.0×10^{-2} M de NAA, en etanol, 4.25 mL de solución acuosa de concentración 1.0×10^{-2} M de \$-CD, 0.50 mL de disolución de sulfito sódico 0.40 M, recién preparada y 0.25 mL de 1,3-DBP. Una vez añadido el NAA, se pasó N_2 para eliminar el etanol. A continuación, se agita durante 5 minutos, para favorecer la formación del complejo de inclusión, y se pasa N_2 durante otros 5 minutos con el fin de completar la desoxigenación de la disolución.

Para NAAM, el tubo desechable de 5.00 mL contenía 0.50 mL de disolución acuosa 5.0×10^{-4} M de NAAM, 4.00 mL de solución acuosa 1.25×10^{-2} M de \$-CD, 0.1 mL de disolución 2.0 M recién preparada de sulfito sódico y 0.05 mL de 1,3-DBP. La agitación se realiza durante 2 minutos, pasando N_2 otros 10 minutos.

En las condiciones descritas, se observa la aparición de una turbidez o precipitado, en consonancia con los datos aportados por otros autores [3,4]. Este precipitado queda depositado en la parte inferior de la cubeta, de ahí que antes de introducirla en el fluorímetro homogeneicemos la disolución invirtiéndola varias veces. Dicha operación la realizaremos en todas las experiencias ya que si no se hiciera la

señal obtenida sería menor. Las condiciones instrumentales se resumen en la Tabla III.A.2.

Tabla III.A.2.- Condiciones instrumentales para la obtención de los espectros de fosforescencia de NAA y NAAM.

Compuesto	λ_{exc} (nm)	Sensibilidad	Rd_{exc}/Rd_{em} (nm)	d_t (ms)	g_t (ms)
NAA	282	905 V	16 /16	1	5
NAAM	282	800 V	8 /8	1	5

d_t : delay time o tiempo de espera

g_t : gate time o tiempo de integración de la señal

Los espectros de fosforescencia a temperatura ambiente, RTP, obtenidos en esas condiciones se encuentran representados en la Figura III.A.7

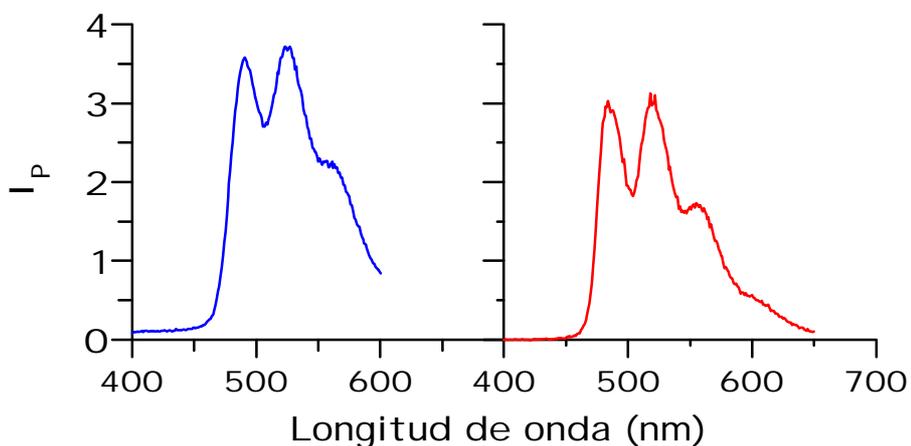


Figura III.A.7.- Espectro de emisión de RTP de los complejos NAA:CD y NAAM:CD en presencia de 1,3-DBP y sulfito sódico.

Se observa una emisión de fosforescencia a temperatura ambiente a longitudes de onda más altas que las obtenidas en fluorescencia, con máximos de emisión a 490 y 525 nm, para NAA, y 483 y 520 nm, para NAAM, de similar intensidad.

Se elige para posteriores medidas 525 y 483 nm como longitudes de onda de emisión de fosforescencia, de NAA y NAAM, respectivamente.

III.A.2.2.- Influencia del tiempo de medida

Se realizaron experiencias con objeto de determinar el tiempo a transcurrir, desde la preparación de las disoluciones, para que la señal obtenida sea máxima.

Para ello se prepararon muestras en sendos tubos desechables de 5.00 mL, que contenían 5.0×10^{-5} M del analito correspondiente, a continuación, se añadieron 4.25 mL de $\text{S-CD } 1.0 \times 10^{-2}$ M, para NAA y 4.00 mL de $\text{S-CD } 1.25 \times 10^{-2}$ M, en el caso de NAAM. Para desoxigenar se emplean 0.50 mL de sulfito sódico 0.40 M, recién preparado y 0.25 y 0.05 mL de 1,3-DBP, para NAA y NAAM, respectivamente.

Las disoluciones de NAA y NAAM se agitan durante 5 y 2 minutos, respectivamente, y una vez en la cubeta de medida se pasa N_2 durante 5 y 10 minutos, para NAA y NAAM, respectivamente. Antes de introducir la cubeta en el fluorímetro se homogeneiza la disolución invirtiendo la cubeta varias veces.

La evolución de la señal con el tiempo se estudia para un volumen introducido en la cubeta de 3.25 mL. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura III.A.8.

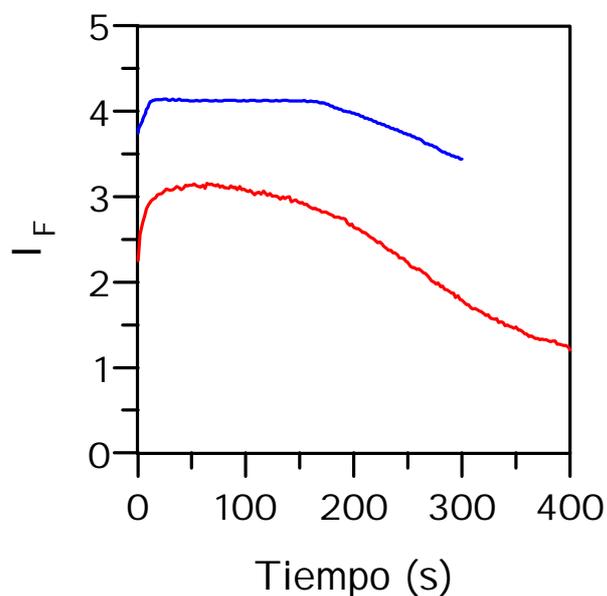


Figura III.A.8. -Evolución de la señal de fosforescencia con el tiempo de disoluciones de NAA y NAAM

En el caso de NAA, se observa un aumento de la señal durante los primeros 15 segundos, a partir de los cuales se mantiene constante durante 160 segundos. Sin embargo, el comportamiento de NAAM es un poco diferente, ya que se produce un aumento de la señal durante los primeros 40 segundos, a partir de los cuales se mantiene constante durante 60 segundos.

En próximas experiencias registraremos el espectro transcurrido 1 minuto desde el momento en el que se introduce en el fluorímetro.

III.A.2.3.- Influencia del contenido de sulfito sódico

Con objeto de estudiar la influencia de la concentración de sulfito en la señal de fosforescencia, se preparan muestras en tubos desechables de 5.00 mL. Todas

ellas contienen una concentración de analito 5.0×10^{-5} M, 4.25 mL de S-CD 1.0×10^{-2} M, para NAA y 4.0 mL de S-CD 1.25×10^{-2} M, para NAAM, en agua. Se añade bromoalcano para que el contenido final del mismo sea del 5.0 y el 1.0 %, para NAA y NAAM, respectivamente, y se adiciona sulfito sódico para que su concentración final varíe entre 0.00 y 0.12 M.

La disolución se agita durante 5 ó 2 minutos, dependiendo del compuesto, tras los cuales ésta se deposita en la cubeta de medida para completar la desoxigenación con paso de N_2 durante 15 minutos. Antes de proceder al registro del espectro se espera 1 minuto. Para registrar los espectros de NAA, el voltaje de la lámpara se situó en 790 V, manteniéndose este valor para las experiencias posteriores.

En la Figura III.A.9 se muestra la evolución de la señal de fosforescencia con la concentración de sulfito sódico.

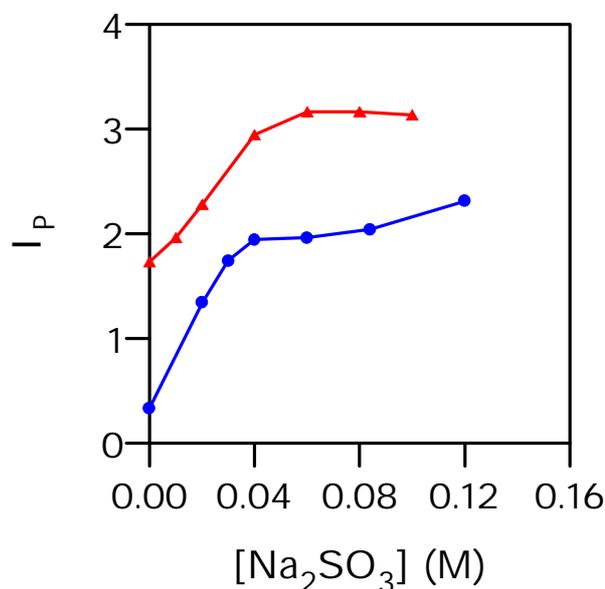


Figura III.A.9.- Influencia de la concentración final de sulfito sódico en la señal de fosforescencia de disoluciones de NAA (▲) y NAAM (●).

Se observa que la señal va aumentando bruscamente hasta que la concentración final de sulfito sódico es de 0.04 y 0.06 M, para NAA y NAAM, respectivamente. A partir de ésta el aumento es más gradual, incluso cuando se triplica el contenido de sulfito sódico en la disolución, en el caso de NAA, mientras que se mantiene prácticamente constante cuando trabajamos con disoluciones de NAAM.

Con el fin de comprobar si es posible reducir el tiempo de paso de N₂, se repitió la experiencia anterior con disoluciones de NAA, pasando nitrógeno durante 5 minutos a cada muestra, y empleando concentraciones finales de sulfito sódico que oscilaron entre 0.00 y 0.04 M.

Los resultados obtenidos no fueron satisfactorios, encontrándose un comportamiento ilógico ya que al aumentar el contenido en sulfito sódico, la señal no va aumentando gradualmente como era de esperar. Debido a ello, en experiencias posteriores se empleará una concentración final de sulfito de 0.09 M y un paso de N₂ de 15 minutos, en el caso de NAA y para NAAM, 0.06 M de sulfito y paso de N₂ de 10 minutos.

III.A.2.4.- Influencia del tiempo de agitación

Se estudió cómo influye el tiempo de agitación de las disoluciones en la señal de fosforescencia, preparando cinco disoluciones en tubos desechables de 5.00 mL, para cada compuesto. Cada uno de ellos contiene al analito en una concentración de 5.0×10^{-5} M. La ciclodextrina y el bromoalcano se añaden en las cantidades descritas anteriormente y el sulfito sódico en la concentración óptima para cada analito.

Cada muestra es sometida a un tiempo diferente de agitación, transcurrido el cual, se procede a la desoxigenación de las disoluciones mediante 15 ó 10 minutos de paso de N_2 , en función del compuesto. Igual que en las experiencias anteriores se espera 1 minuto antes de registrar el espectro.

En la Figura III.A.10 se muestran que en el caso de NAA, la señal de fosforescencia aumenta rápidamente con el tiempo de agitación hasta que éste es de 1 minuto, para mantenerse máxima y prácticamente constante hasta los 3 minutos. Tiempos de agitación superiores originan una disminución de la señal. Si consideramos las disoluciones de NAAM, la señal de fosforescencia aumenta rápidamente con el tiempo de agitación hasta que éste es de 2 minutos. Tiempos superiores originan una disminución.

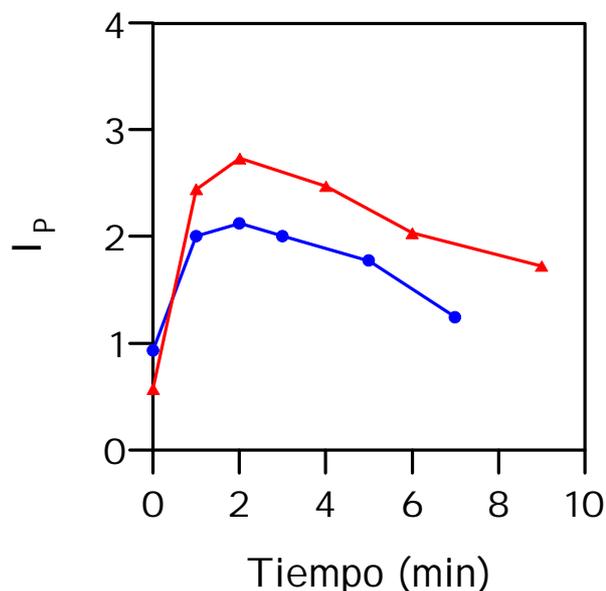


Figura III.A.10. - Influencia del tiempo de agitación de disoluciones de NAA (!) y NAAM (•).

En experiencias sucesivas, las muestras serán agitadas durante 2 minutos, en ambos casos.

III.A.2.5.- Influencia del paso de N₂

Para determinar el tiempo óptimo de paso de N₂ a través de la disolución, para su desoxigenación, se preparan cuatro disoluciones idénticas que contienen una concentración del analito 5.0×10^{-5} M. La disolución de S-CD se adiciona en las mismas concentraciones que en experiencias anteriores y el sulfito sódico se añade recién preparado. Por último, también se incluye en las disoluciones un 5.0% en volumen de 1,3-DBP, para NAA y un 1.0 % para NAAM. Se agita la disolución durante 2 minutos con el fin de facilitar la formación del complejo de inclusión y se pasa N₂ entre 0 y 15 minutos. Antes de registrar el espectro se espera 1 minuto.

Los resultados obtenidos se recogen en la Figura III.A.11.

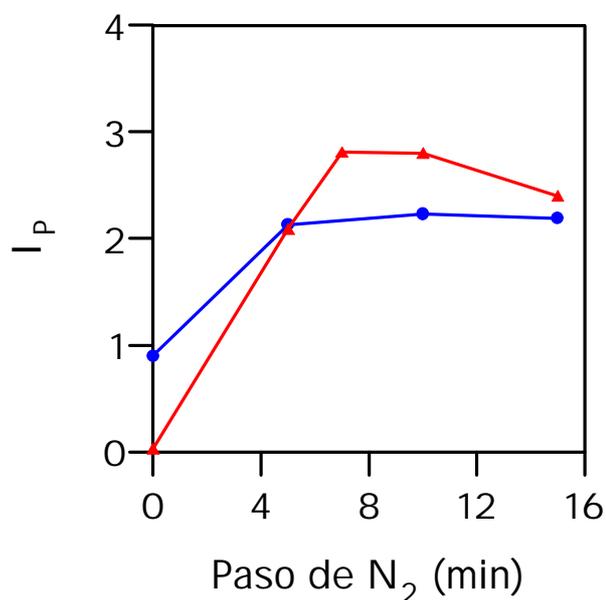


Figura III.A.11.- Influencia del tiempo de paso de N₂ en la señal de fosforescencia de disoluciones de NAA (▲) y NAAM (●).

De esta Figura concluimos que, en el caso de NAA, a partir de 5 minutos, la señal de fosforescencia se hace prácticamente independiente del tiempo de paso de N_2 . Para NAAM, entre 7 y 10 minutos la señal es máxima y prácticamente constante, observándose una disminución de ésta para tiempos superiores a 10 minutos. Así que en próximas experiencias el tiempo de paso de N_2 será de 8 minutos, en ambos casos.

III.A.2.6.- Influencia del contenido de 1,3-DBP

Para conocer cómo afecta a la señal de fosforescencia el contenido de 1,3-DBP en las disoluciones, se preparan muestras en tubos desechables de 5.00 mL.

Todos ellos contienen concentraciones finales de NAA 3.0×10^{-5} M y de NAAM 5.0×10^{-5} M. La concentración presente de ciclodextrina en disoluciones de NAA y NAAM es de 8.5×10^{-3} M y 1.0×10^{-2} M, respectivamente, añadiéndose el sulfito sódico recién preparado. A continuación, se adicionan contenidos crecientes de 1,3-DBP. Se agitó durante 2 minutos y se pasó N_2 otros 8 minutos, registrando los espectros correspondientes transcurrido 1 minuto.

Los resultados obtenidos en esta experiencia se representan en la Figura III.A.12. En ella se observa, considerando NAA, un aumento de la señal de fosforescencia a medida que aumenta el contenido en 1,3-DBP, hasta que éste alcanza un 2.0%, disminuyendo cuando se supera el 3.0%, y manteniéndose prácticamente constante para contenidos mayores o iguales al 6.0% de 1,3-DBP.

Teniendo en cuenta las disoluciones de NAAM, la señal aumenta bruscamente a medida que lo hace el contenido en 1,3-DBP, hasta que se alcanza un 0.3%, disminuyendo cuando se supera el 0.5%, y manteniéndose prácticamente constante

para contenidos mayores o iguales al 2.0%.

A la vista de estos datos, se decide tomar el 3.0 % (adición de 0.15 mL) y el 0.4 % (adición de 0.02 mL) de 1,3-DBP, para ser añadidos en disoluciones de NAA y NAAM, respectivamente.

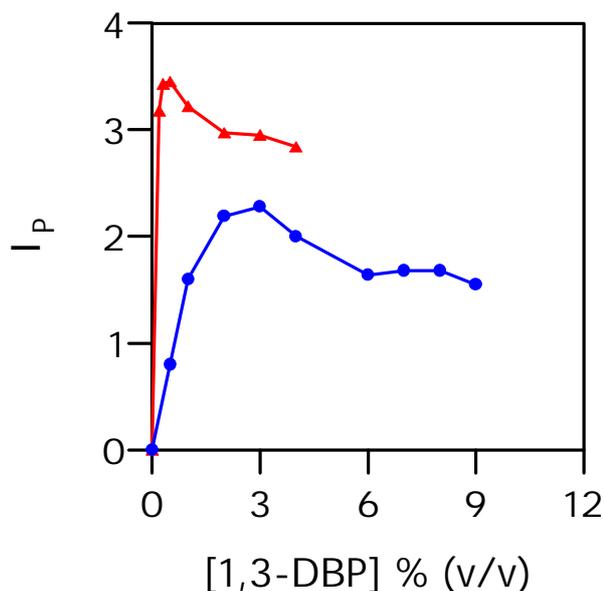


Figura III.A.12. - Influencia del contenido de 1,3-DBP en la intensidad de fosforescencia de disoluciones de NAA (!) y NAAM (•).

III.A.2.7.- Influencia de la concentración de \$-CD

Una vez optimizadas todas las condiciones de trabajo, vamos a comprobar que un aumento en la concentración de \$-CD influye en la señal de fosforescencia, aumentándola. Para ello, se preparan en tubos desechables cuatro disoluciones que contienen 0.50 mL de una disolución 5.0×10^{-4} M de NAAM, 0.15 mL de una solución de sulfito 2.0 M, recién preparada, 0.02 mL de 1,3-DBP y contenidos crecientes de \$-CD 1.25×10^{-2} M.

Se agita la disolución durante 2 minutos, transcurridos los cuales se procede a completar la desoxigenación mediante 8 minutos de paso de N_2 y se registra el espectro transcurrido 1 minuto. En la Figura III.A.13 se representan los resultados encontrados.

En ella se observa que la intensidad de fosforescencia aumenta con el contenido de β -CD, siendo máxima para una concentración final de 1.0×10^{-2} M. No se emplean concentraciones superiores debido a la insolubilidad que ésta presenta en agua.

Como concentraciones óptimas de β -CD se eligen 8.6×10^{-3} M, para NAA y 1.0×10^{-2} M, para NAAM.

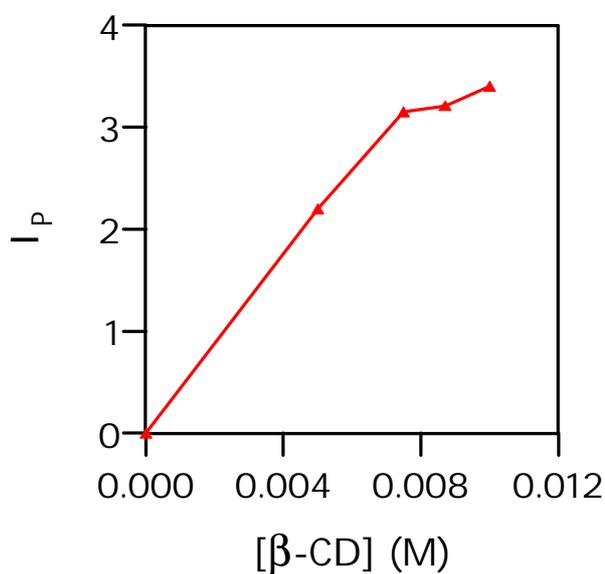


Figura III.A.13.- Influencia de la concentración de β -CD en la señal de fosforescencia de disoluciones de NAAM

III.A.2.8.- Rectas de calibrado

El trazado de la recta patrón se realiza registrando los espectros de emisión de fosforescencia de cada una de las muestras, preparadas por triplicado, en un intervalo de concentración comprendido entre 0.48 y 1.86 : g mL⁻¹ de NAA y 0.46 y 4.60 : g mL⁻¹ de NAAM. Se emplean las concentraciones de S-CD, sulfito sódico y 1,3-DBP elegidas como óptimas, para cada uno de los analitos, siendo las condiciones instrumentales las que se recogen en la Tabla III.A.3.

Tabla III.A.3.- Condiciones instrumentales para la obtención de los espectros de fosforescencia de NAA y NAAM.

Compuesto	$\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ (nm)	Sensibilidad	Rd_{exc}/Rd_{em} (nm)	t_d (ms)	t_g (ms)
NAA	282/525	790 V	16 /16	1	5
NAAM	282/483	800 V	8 /8	1	5

t_d : "delay time" o tiempo de espera

t_g : "gate time" o tiempo de integración de la señal

Se agitan las disoluciones durante 2 minutos y una vez depositadas en la cubeta de medida, se completa la desoxigenación pasando N₂ durante 8 minutos. Se registra el espectro transcurrido 1 minuto.

En las mismas condiciones, se prepara un blanco en ausencia de analito.

III.A.2.7.1. Ecuación de la recta de calibrado y parámetros estadísticos¹

El cálculo de la ecuación de la recta de calibrado, se ha realizado aplicando el modelo estadístico de la regresión lineal ordinaria, que permite, no sólo encontrar dicha ecuación con el menor error a partir de las medidas experimentales, sino que nos da una medida de la imprecisión de este cálculo. Dicha ecuación, que relaciona la concentración de analito (x) con la señal analítica (y), viene expresada como:

$$y = a + bx \quad (1)$$

La aplicación de este algoritmo implica la aceptación de tres supuestos:

- Los errores se producen únicamente en la medida de la señal instrumental.
- El error en la medida de la señal debe estar normalmente distribuido.
- El error absoluto de la medida de la señal instrumental debe ser constante e independiente de la concentración de la disolución patrón (homocedasticidad).

Los resultados obtenidos en el calibrado se representan en la Figura III.A.14.

¹ Los cálculos estadísticos de la recta de calibrado se han efectuado utilizando el programa ALAMIN, desarrollado en el Departamento de Química Analítica de la Universidad de Granada, Tesis Doctoral Ana M^a García Campaña. Universidad de Granada, 1995.

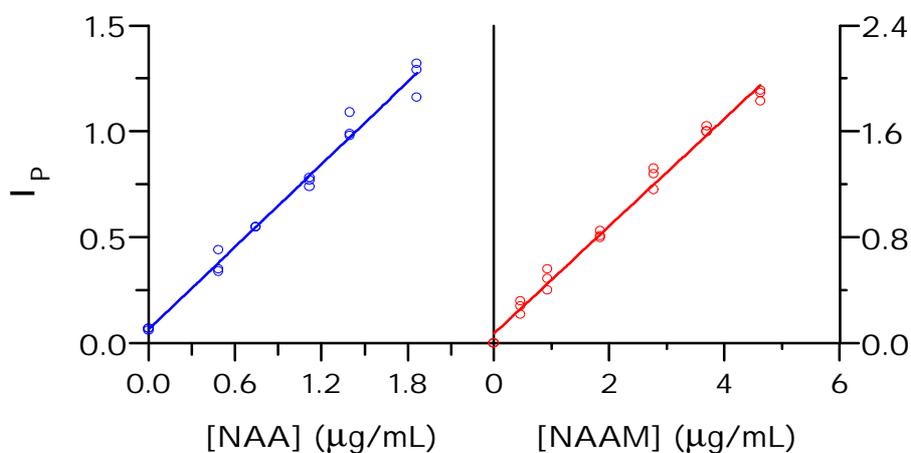


Figura III.A.14. - Recta de calibrado obtenida para NAA (•) y NAAM (•)

Con los datos experimentales obtenidos, se han calculado los valores de la pendiente, b , y de la ordenada en el origen, a , partiendo de las ecuaciones correspondientes (Ecuaciones 2 y 3) [5,6]. Hay que destacar que deben de tomarse las parejas de valores de forma individual y no calcular la media de las señales para cada patrón de concentración.

$$b = \frac{\sum [(y_i - \bar{y})(x_i - \bar{x})]}{\sum (x_i - \bar{x})^2} \quad (2)$$

$$a = \bar{y} - b\bar{x} \quad (3)$$

En la expresión (2), y_i representa el valor de la señal del instrumento obtenido para una concentración x_i de analito patrón, \bar{x} e \bar{y} , son los valores medios del conjunto de concentraciones y señales obtenidas, respectivamente.

Asimismo, se ha calculado la desviación estándar de regresión, $s_{y,x}$, de y sobre x, mediante la ecuación (4).

$$s_{y,x} = \sqrt{\frac{1}{n-2} \sum (y_i - y_i^x)^2} \quad (4)$$

y_i^x es el valor de la señal calculado sobre la recta de regresión correspondiente a la concentración x_i y n es el número total de parejas de puntos utilizados para calcular la recta de regresión.

La desviación estándar de regresión, $s_{y,x}$, mide la dispersión de las señales analíticas medidas alrededor de la recta de calibrado ajustada. Si $s_{y,x}$ es igual a cero indica que todos los valores medidos están sobre la recta de regresión. Su valor indica el error experimental que afecta a la regresión de los datos y puede considerarse, en primera aproximación, una medida de la bondad del ajuste de los datos experimentales a la recta.

A partir de la desviación estándar de regresión $s_{y,x}$, se calcula la desviación estándar de la pendiente, s_b , mediante la expresión (5). Su valor es una medida del error que se comete en la determinación de la pendiente de la recta de regresión, y va a incidir en el error de las concentraciones predichas utilizando la ecuación del calibrado, a partir de valores de la señal analítica.

$$s_b = s_{y,x} \sqrt{\frac{1}{\sum (x_i - \bar{x})^2}} \quad (5)$$

La desviación estándar de la ordenada en el origen, s_a , es una medida del error máximo que se comete cuando se predice un valor de señal analítica a partir de un

determinado valor de concentración de analito y se calcula a través de la ecuación (6)

$$S_a = S_{y,x} \sqrt{\frac{\sum x_i^2}{n \sum (x_i - \bar{x})^2}} \quad (6)$$

Acompañando a la ecuación ajustada, se ha calculado el valor del coeficiente de correlación de Pearson, r , dado por la ecuación (7). Sin embargo, es el coeficiente de determinación, r^2 , el que estima mejor la calidad del ajuste.

$$r = \frac{\sum [(y_i - \bar{y})(x_i - \bar{x})]}{\left[\sum (y_i - \bar{y})^2 \sum (x_i - \bar{x})^2 \right]^{1/2}} \quad (7)$$

La determinación de la concentración de analito en una disolución problema se obtiene por aplicación directa de la ecuación de la recta de regresión. Sin embargo, la estimación de la imprecisión asociada a dicha determinación es más compleja, ya que depende tanto del error en la medida de la señal, como de los errores que implican el uso de la pendiente y de la ordenada en el origen.

La expresión general que calcula la desviación estándar de la concentración sobre los resultados obtenidos en una serie de análisis repetitivos viene dado por (8).

$$S_x = \frac{S_{y,x}}{b(1-g)} \sqrt{(1-g) \left(\frac{1}{m} + \frac{1}{n} \right) + \frac{(y - \bar{y})^2}{b^2 \sum (x_i - \bar{x})^2}} \quad (8)$$

donde los distintos términos representan:

b: pendiente de la recta de regresión.

$s_{y,x}$: desviación estándar de regresión de y en x.

m: número de repeticiones del análisis.

n: número de parejas de datos.

\bar{y} : media aritmética de los valores de señal obtenidos a partir de m análisis.

\hat{y} : media aritmética de todos los valores de señal utilizados en el cálculo de la recta de regresión.

\bar{x} : media aritmética de todos los valores de concentración utilizados en el calibrado.

x_i : valor concreto de concentración.

g: función que viene dada por la expresión (9):

$$g = t^2 \frac{s_{y,x}^2}{b^2 \sum (x_i - \bar{x})^2} \quad (9)$$

Se utiliza un valor de la t de Student para un nivel de confianza de $1 - \alpha$ (generalmente $\alpha = 0,05$) con n-2 grados de libertad.

Como se puede observar, cuando la función g toma valores despreciables frente a 1, la ecuación queda reducida a :

$$s_x = \frac{s_{y,x}}{b} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(y - \bar{y})^2}{b^2 \sum (x_i - \bar{x})^2}} \quad (10)$$

Los valores estadísticos obtenidos para las rectas de calibrado se reúnen en la Tabla III.A.4.

Tabla III.A.4.- Parámetros estadísticos obtenidos en la calibración univariante de NAA y NAAM.

	NAA	NAAM
Ordenada en el origen: a	0,07	0,07
Desviación estándar de a : s_a	0,02	0,02
Desviación estándar relativa de "a": DER (%)	32,5	33,5
Pendiente: b	0,65	0,406
Desviación estándar de b : s_b	0,02	0,009
Desviación estándar relativa de "b": DER (%)	2,9	2,3
Desviación estándar de regresión: $s_{y,x}$	0,05	0,07
Coefficiente de correlación: r	0,993	0,995
Coefficiente de determinación: r^2	0,986	0,99
g	0,004	0,002

III.2.8.2. Parámetros de fiabilidad

Los parámetros de fiabilidad del método: linealidad, sensibilidad, precisión y límites de detección y determinación han sido determinados mediante el modelo de regresión lineal, a partir del conjunto de datos obtenidos de la experiencia de calibrado. En el cálculo del límite de detección se ha utilizado el criterio de Clayton [7] y el de Winefordner y Long [8].

a) Linealidad. - Para la condición de la linealidad se hace uso de los datos de la recta de calibrado. Se define a partir de la desviación estándar relativa de la pendiente, DER (b) y se calcula por el cociente del valor de s_b (**5**) entre b , según la

siguiente expresión:

$$\text{Linealidad (\%)} = [1 - \text{DER (b)}] \times 100 = [1 - (s_b / b)] \times 100 \quad (11)$$

b) Sensibilidad. - Como medida de la sensibilidad, se ha hecho uso de una expresión derivada del análisis de la regresión, cuyo valor es característico del calibrado del método instrumental, y permite ser utilizado como criterio de comparación (4), definiéndose como la relación entre la desviación estándar de regresión, $s_{y,x}$, y la pendiente, b .

$$\text{Sensibilidad analítica} = s_{y,x} / b \quad (12)$$

c) Límite de detección. - En la definición propuesta por la IUPAC [9,10], el límite de detección se define como tres veces la desviación estándar relativa de la señal analítica correspondiente al "blanco" dividido por la pendiente de la recta de calibrado.

$$\text{LOD} = 3 s_{\text{blanco}} / b$$

Con esta definición, en realidad se está calculando la desviación estándar de la concentración correspondiente al blanco, y no se toma en consideración la imprecisión del valor de la pendiente. Este modelo ha sido ampliamente discutido en un documento del *Analytical Methods Committee* [11], y en un trabajo crítico de Long y Winefordner [8], en éste se propone un modelo de cálculo basado en la propagación de errores, a utilizar cuando la imprecisión de la pendiente y del término independiente son del mismo orden de magnitud que la correspondiente a la medida de la señal analítica.

Teniendo en cuenta estas consideraciones hemos calculado directamente el valor de s_x calculado a partir de las ecuaciones 8 ó 10 utilizando los valores de la señal del "blanco" medidos para establecer la recta de calibrado [8,12,13]. De esta forma, el límite de detección se calcularía, como se indica en la ecuación

$$\text{LOD} = 3s_{\text{blanco}} \quad (15)$$

Así mismo, hemos utilizado el modelo propuesto por Clayton y col. [7] que permite calcular un límite de detección con garantías de probabilidad sobre el falso positivo (error estadístico α) y el falso negativo (error estadístico β).

Se obtiene igualmente utilizando el valor de la desviación estándar de los blancos, estimada sobre la concentración, s_{c_0} . Este valor, se ha obtenido, como ya hemos indicado, a partir de la aplicación del modelo de regresión con réplicas para cada valor de concentración.

Los dos tipos de probabilidades que considera Clayton para evaluar el procedimiento analítico son:

- Probabilidad de falso positivo; probabilidad de afirmar que está presente el analito cuando no es cierto (Error α).
- Probabilidad de falso negativo; probabilidad de afirmar que no hay analito cuando sí lo hay (Error β).

En la definición de la IUPAC, mediante las sucesivas repeticiones del blanco analítico, se obtiene una estimación de la señal media, \bar{y}_0 , y de la desviación estándar, s_0 . De este modo, es posible disponer de un intervalo de confianza unilateral para la medida teórica, μ_0 , de la señal del blanco al nivel de significación α . El intervalo de

señales cumple la siguiente ecuación:

$$\bar{y}_o + k s_o$$

correspondiéndose ésta con el valor que toma la señal de detección, y_d , donde k toma diferentes valores en función de α (para $\alpha = 0.05$, $k = 3$).

Según esto, dada una muestra problema, la probabilidad de tener una señal por encima de \bar{y}_o , y por tanto, de afirmar que en ella hay analito, es α ; es decir, la regla de la IUPAC solo evalúa la probabilidad de un falso positivo en el análisis de la muestra problema, pero no evalúa la probabilidad de un falso negativo. Si existe la misma distribución normal para el blanco analítico que para una muestra con la concentración x_d , correspondiente a la señal de detección y_d (límite de detección de la IUPAC), se deduce que vale 0.5 la probabilidad de tener una señal por debajo de y_d , resultando que la probabilidad de falso negativo es del 50% [12].

El límite de detección propuesto por Clayton resuelve este inconveniente considerando la misma probabilidad para el falso positivo y negativo ($\alpha = \beta = 0.05$), obteniéndose para éste, un valor más elevado que el obtenido siguiendo el criterio de la IUPAC. Se calcula según la expresión:

$$LOD = s_{co} \cdot t_{(\alpha, \beta)}$$

donde el valor $t_{(\alpha, \beta)}$, se encuentra tabulado en función del número de grados de libertad ($n-2$) y del nivel de significación seleccionado para los errores α y β . En nuestro caso, hemos utilizado unos valores de $\alpha = 0.05$ y $\beta = 0.05$ y se han efectuado, en el caso de NAA, 18 medidas para calcular la recta de calibrado, luego $n = 18$, $t_{(n-2, 0.05, 0, 0.5)} = 3.44$. El valor de $t_{(n-2, 0.05, 0, 0.5)}$ fue de 3.42, para

NAAM, ya que se realizaron 21 medidas, $n = 21$.

Cuando no se dispone de la señal del blanco, el límite de detección se calcula mediante la siguiente expresión **(16)**:

$$LD = \frac{3s_{y_0}}{b} \quad (16)$$

d) Límite de determinación. - El límite de determinación o cuantificación se calcula sustituyendo en la ecuación **(15)** el valor 3 por el 10 [9,11] tal y como se indica en la siguiente ecuación:

$$LOQ = 10s_{\text{blanco}} \quad (17)$$

En técnicas, como HPLC, en las que no se dispone de la señal del blanco, la expresión que se emplea para la obtención de este límite viene dado por **(18)**:

$$LOQ = \frac{10s_{y_0}}{b} \quad (18)$$

Donde s_{y_0} se calcula mediante la expresión **(19)**

$$s_{y_0} = s_{y,x} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{\sum (x_i - \bar{x})^2}} \quad (19)$$

La estimación de todos los parámetros analíticos del método, calculados a

partir del modelo de regresión, que utiliza los datos del calibrado, se reúne en la Tabla III.A.5.

Tabla III.A.5. - Parámetros de fiabilidad aplicando el modelo de regresión lineal para NAA y NAAM

	NAA	NAAM
Linealidad (1-DER (b)) %	97,1	97,7
Sensibilidad analítica (∴ g mL⁻¹)	0,08	0,17
Desviación estándar del blanco	0,05	0,11
Límite de determinación (IUPAC)	0,55	1,14
LD, Clayton, (∴ g mL⁻¹)	0,19	0,39
LD, Winefordner y Long, (∴ g mL⁻¹)	0,10	0,18

e) Repetitividad. - La repetitividad de las medidas permite tener una idea de la precisión del método propuesto. Ésta mide el grado de incertidumbre que podemos esperar de los resultados analíticos obtenidos a partir de un calibrado. Matemáticamente, la precisión viene dada por la desviación estándar relativa, calculada dividiendo la desviación estándar, s_x , entre el valor medio de la concentración determinado, \bar{x} , y expresada en forma de porcentaje (DER %).

Para evaluarla, la IUPAC proponía preparar una serie de muestras que contenían un valor de concentración que, por lo general, correspondía al valor intermedio dentro del intervalo establecido en la recta de calibrado. A partir de las señales obtenidas se calculaban las concentraciones mediante la recta de calibrado y se determinaba la desviación estándar relativa, DER (%), para la concentración elegida.

En ese sentido, se prepararon una serie de 14 muestras conteniendo una concentración de NAA y de NAAM de 1.37 y 3.20 : g mL⁻¹, respectivamente. Los valores obtenidos de DER (%) para NAA y NAAM son de 3.97 y 3.70 %, respectivamente.

Sin embargo, hay autores que plantean que sería mucho más correcto conocer el valor de DER para todos los valores de concentración utilizados en el establecimiento de la recta de calibrado. De ese modo, como se dispone de 3 réplicas para cada valor de concentración, se procede a la representación de la desviación estándar relativa en función de la concentración, Figura III.A.15.

Mediante la representación gráfica de DER (%), para cada uno de los valores de concentración del calibrado, es posible, por interpolación, estimar la precisión para cualquier valor de concentración dentro del rango lineal.

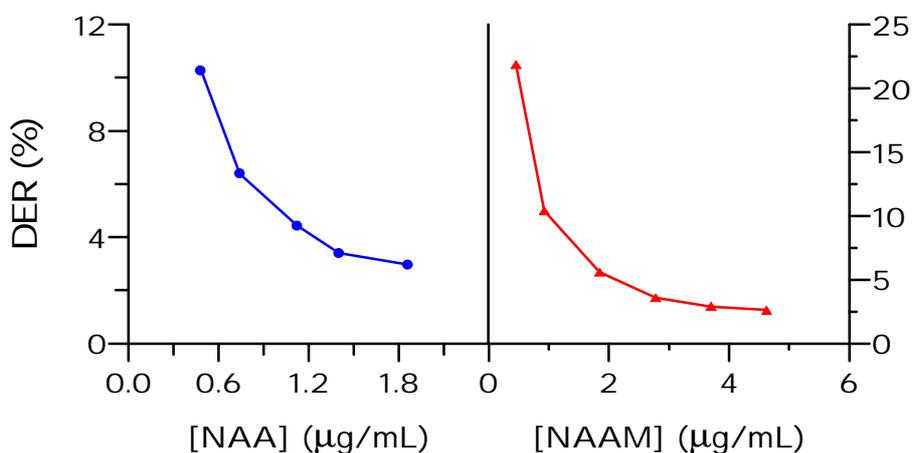


Figura III.A.15. - Variación de la precisión del método analítico en función de la concentración de NAA (!) y NAAM (•).

III.A.2.8.3.- Método operatorio

Como consecuencia del estudio realizado, se propone el siguiente método operatorio. En tubos desechables de 5.00 mL se introducen volúmenes crecientes de herbicida para que su concentración final esté comprendida dentro del rango de aplicación del método. Se adiciona el volumen de S-CD necesario para fijar el contenido de ésta en el medio. A continuación, se añade 1,3-dibromopropano y sulfito sódico recién preparado, enrasando con agua. De forma análoga se preparan los blancos.

Las disoluciones se agitan durante 2 minutos y una vez depositadas en la cubeta de medida, se completa la desoxigenación de la muestra pasando N_2 durante 8 minutos. Antes de registrar los espectros se espera 1 minuto para evitar irreproducibilidades en la medida.

En la Tabla III.A.6 se resumen las concentraciones finales de cada uno de los reactivos añadidos en un volumen final de 5.00 mL.

Tabla III.A.6.- Concentraciones finales de los reactivos añadidos.

Compuesto	[S-CD] (M)	1,3-DBP (%)	[$\text{Na}_2 \text{SO}_3$] (M)
NAA	$8,6 \times 10^{-3}$	3,0	0,09
NAAM	$1,0 \times 10^{-2}$	0,4	6,0

En la Tabla III.A.7 se resumen las variables instrumentales y los rangos de aplicación a emplear con cada fitohormona.

Tabla III.A.7.- Método operatorio.

Compuesto	$\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ (nm)	Sensibilidad (V)	Rd_{exc}/Rd_{em} (nm)	Rango ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
NAA	37281	790 V	16 /16	0,55 -1,86
NAAM	282/483	800 V	8 /8	1,14 -4,63

III.A.3.- INFLUENCIA DEL TIPO DE ÁTOMO PESADO EN LA SEÑAL DE RTP

Para completar esta investigación se decidió realizar un estudio comparativo de RTP empleando como átomos pesados el 2-bromoetanol, 2,3-dibromopropanol, 1,2-dibromoetano, además del 1,3-dibromopropano, objeto de nuestra experiencia. Tanto las condiciones instrumentales como las químicas fueron las optimizadas en experiencias anteriores.

Se realizó este ensayo considerando por una parte, $1.86 \mu\text{g mL}^{-1}$ de NAA, y por otra $2.78 \mu\text{g mL}^{-1}$ de NAAM, con el fin de poder establecer alguna relación con el trabajo publicado por nuestro Departamento [14], en el que se emplearon bromoalcoholes como átomos pesados.

Los resultados obtenidos se recogen en la Figura III.A.16 donde se presentan los espectros obtenidos en el estudio realizado. Como se deduce de los datos obtenidos, la señal dada por los dos alcoholes es despreciable, con el método propuesto, frente a la señal ofrecida por los alcanos, y especialmente el 1,3-dibromopropano.

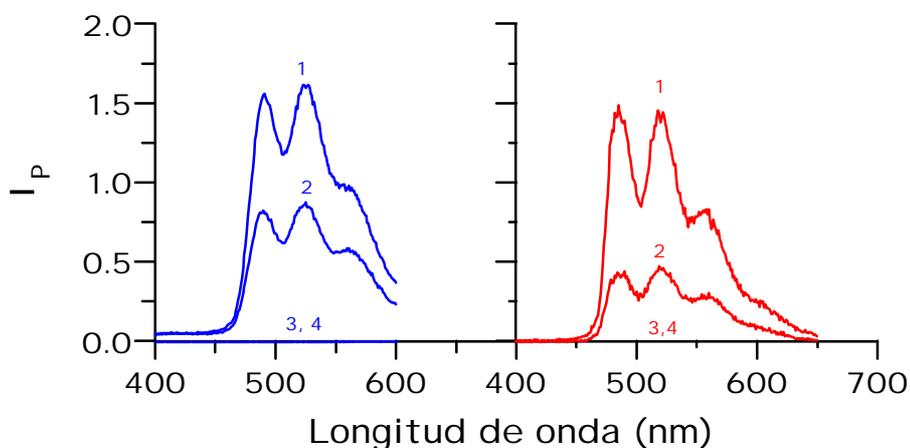


Figura III.A.16.- Espectros de fosforescencia obtenidos al emplear como átomos pesados: 1) 1,3-dibromopropano, 2) 1,2-dibromoetano, 3) 2-bromoetano, 4) 2,3-dibromopropanol, en disoluciones de NAA y NAAM.

Queremos señalar que las condiciones empleadas en nuestro trabajo difieren de las que en su día se utilizaron con el 2,3-dibromopropanol y el 2-bromoetano [14]. En este trabajo se advertía que el modo de preparar las disoluciones era fundamental para la obtención de RTP, llegando a la conclusión de que era necesario añadir por pesada la β -CD, en vez de en disolución, para obtener señales adecuadas, algo que no se realiza en nuestro trabajo debido al tiempo que se tarda en disolverla.

Éstas podrían ser las razones por las que la señal obtenida cuando se usan los dos alcoholes es insignificante si la comparamos con la de los alcanos, siendo además el 1,3-dibromopropano el compuesto con el que mayor señal de RTP se consigue.

III.A.4.- ESTUDIO MICROSCÓPICO Y MODELACIÓN MOLECULAR DE LOS COMPLEJOS DE INCLUSIÓN

III.A.4.1.- ESTUDIO MICROSCÓPICO

W. Jin y col. [15] realizaron estudios sobre la emisión de RTP de distintos hidrocarburos aromáticos policíclicos y compuestos heterocíclicos nitrogenados, incluidos en β -ciclodextrina. Entre los hidrocarburos aromáticos heterocíclicos se encontraban fenantreno, naftaleno, fluoranteno, pireno y acenafteno, mientras que entre los compuestos heterocíclicos nitrogenados se encontraban quinolina, isoquinolina, 4-metilquinolina, 7-metilquinolina, 1,10-fenantrolina, 7,8-benzoquinolina y carbazol.

En todos los casos estudiados, estos autores encontraron que las señales de fosforescencia sólo eran suficientemente intensas cuando aparecía turbidez o precipitados en el sistema. De los átomos pesados que ensayaron, las señales de fosforescencia más intensas se encontraron en presencia de bromoalcanos y de ciclohexano.

En consonancia con estos resultados, en nuestro sistema se produce un efecto significativo al aparecer turbidez en el mismo, que origina una intensificación de la RTP, y la consiguiente estabilización del estado triplete. Este efecto explica las diferencias encontradas al comparar la emisión de fosforescencia que se produce en presencia de bromoalcoholes (disoluciones transparentes) y en presencia de bromoalcanos (disoluciones turbias).

Con objeto de conocer las características del precipitado observado, hemos llevado a cabo un estudio mediante microscopía óptica. Para ello, preparamos una disolución que contenía 1.86 g mL^{-1} de NAA, en presencia de β -CD en concentración final $8.5 \times 10^{-3} \text{ M}$, 3.0 % de 1.3DBP y 0.09 M en Na_2SO_3 , recién preparado.

Una vez homogeneizada la disolución, se tomó una pequeña muestra de la misma con un tubo capilar y fue depositada en un porta.

Para realizar el estudio se utilizó un microscopio Nikon EPIPHOT 300. Los resultados obtenidos, al utilizar un aumento de 730, se representan en la Figura III.A.17. En ella puede observarse que el precipitado que aparece suspendido en la disolución está compuesto por microcristales de β -ciclodextrina, con un tamaño del orden de las micras.

Del mismo modo se procedió al estudio del precipitado formado con NAAM, encontrándose con imágenes muy similares.

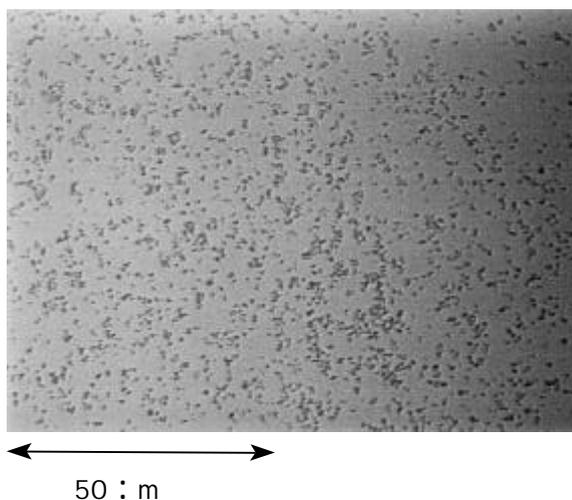


Figura III.A.17.- Fotografía microscópica de una disolución del complejo ternario formado por β -CD:NAA:1,3-DBP

III.4.2. - ESTUDIO MEDIANTE MODELACIÓN MOLECULAR

Con objeto de caracterizar los complejos de inclusión formados entre β -CD, NAA y 1,3-DBP, hemos efectuado un estudio de modelación molecular utilizando el programa Hyperchem, versión 5.1, en un Pentium III 500, construyéndose los modelos correspondientes a β -CD, NAA, NAAM y 1,3-DBP que se representan en la Figura III.A.18.

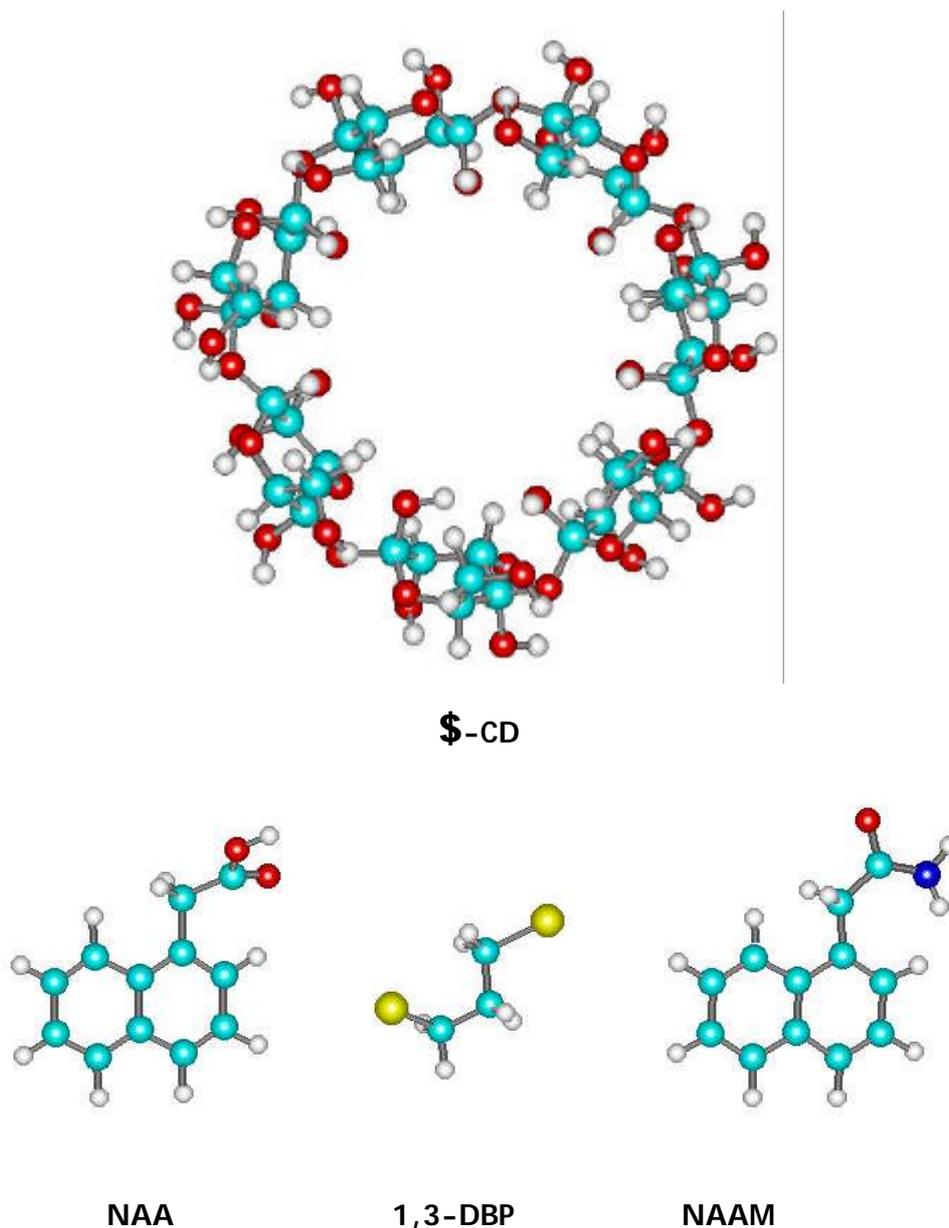
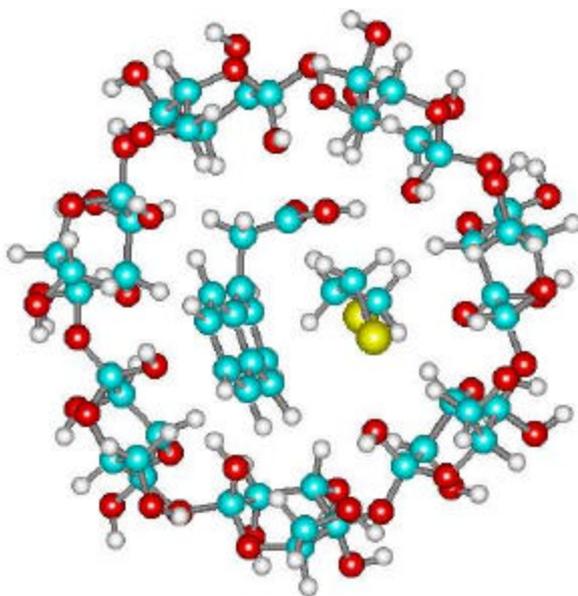


Figura III.A.18.- Modelos de β -CD, NAA, 1,3-DBP y NAAM.

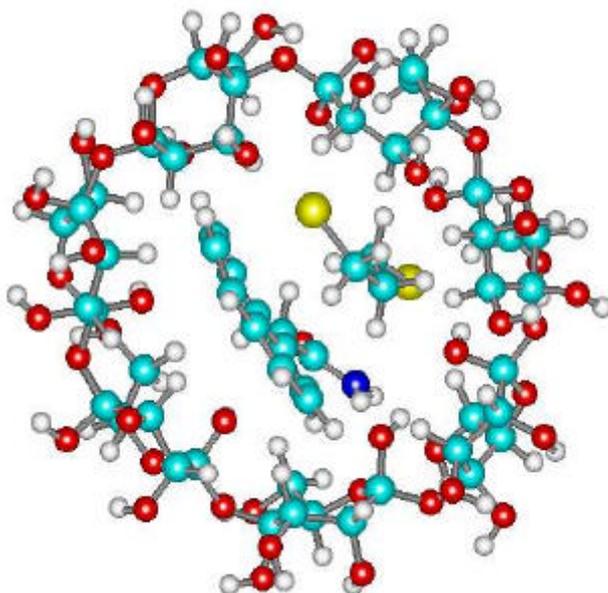
Por último, se han incluido la molécula de dibromopropano y la correspondiente fitohormona dentro de la cavidad de la ciclodextrina, efectuándose una optimización de la energía del sistema mediante el método semiempírico de mecánica molecular AM1. El modelo obtenido se representa en la Figura III.A.19.

A la vista del modelo, podemos concluir que en la cavidad de β -ciclodextrina existe un espacio suficiente como para que puedan incluirse simultáneamente NAA y 1,3-DBP, o NAAM y 1,3-DBP formando, en ambos casos, un complejo ternario. Así, el estudio efectuado corrobora las evidencias espectroscópicas ya discutidas acerca

de la formación del complejo β -CD:fitohormona:1,3-DBP en nuestro sistema. El analito se incluye verticalmente.



β -CD:NAA:1,3-DBP



β -CD:NAAM:1,3-DBP

Figura III.A.19.- Modelos de los complejos de inclusión.

III.A.4.3. - DISCUSIÓN

Con respecto a los sistemas en estudio podemos concluir en primer lugar, la formación de los complejos ternarios compuestos por el bromoalcano, la ciclodextrina y el analito, ya sea NAA o NAAM.

En segundo lugar, dado que existe bromoalcano en exceso disperso en la disolución acuosa de ciclodextrina, se forma una suspensión en nuestras condiciones de trabajo. Así, la β -CD y las moléculas incluidas en su cavidad, se separan formando microcristales que quedan en suspensión. Ésta es la responsable de la turbidez observada, y los microcristales formados no se depositan en el fondo con rapidez debido, precisamente, a la suspensión producida por el exceso de bromoalcano.

No hay duda que la formación del complejo de inclusión del luminóforo en la ciclodextrina, es un factor importante que origina un microentorno rígido en el sistema. Pero también hay que tener en cuenta que, a la vez, se forman los microcristales que benefician la estabilización del estado triplete y tienen como efecto un incremento notable en la emisión de la RTP. La formación de estos microcristales es asimismo un proceso que aporta rigidez al sistema.

Por último, podemos concluir que en el sistema estudiado, los procesos que aportan rigidez pueden completarse en dos etapas: una primera etapa de complejación, y una segunda etapa de formación de los cristales. Así, la presencia del bromoalcano es muy importante en la consecución de la RTP, al inducir las acciones siguientes:

- *Efecto de átomo pesado.*- El bromo del bromoalcano está más cerca del compuesto fosforescente en un complejo trimolecular formado por el bromoalcano: β -CD:analito, lo cual conduce a un efectivo acoplamiento espín-orbital del átomo pesado con el analito. Esta acción aumenta la probabilidad de emisión desde el estado triplete.

- *Suspensión / cristalización.*- Dada la dispersión del disolvente orgánico, la mayor parte del sistema no está en disolución, sino que se forman microcristales de β -CD y de los componentes incluidos en su cavidad. De este modo, el estado triplete se estabiliza aún más.

III.A.5. - BIBLIOGRAFÍA

- [1] A. Muñoz de la Peña, I. Durán-Meras, F. Salinas, I. M. Warner y T. T. Ndou, *Anal. Chim. Acta*, 255 (1991) 351
- [2] F. García Sánchez, A. Navas Díaz, A. García Pareja, *J. Liq. Chromatogr.*, 18 (1995) 2543
- [3] S. Zhang, C. Liu, Y. Bu, *Fenxi Huaxue*, 16 (1988) 495
- [4] S. Zhang, C. Liu, Y. Bu, *Ibid*, 16 (1988) 682
- [5] J. D. Hwang, J. D. Winefordner, *Prog. Analyt. Spectrosc.*, 11 (1988) 209
- [6] J. C. Miller, J. N. Miller, "Estadística para Química Analítica", Addison-Wesley. Iberoamericana, Wilmington, USA (1993)
- [7] C.A. Clayton, J.W. Hines, P.D. Elkins, *Anal. Chem.*, 59 (1987) 2506
- [8] G. L. Long, J. D. Winefordner, *Ibid*, 55 (1983) 712 A
- [9] "Nomenclature, Symbols, Units and their usage in Spectrochemical Analysis II", *Spectrochim. Acta*, 33B (1978) 242
- [10] "Guidelines for Data Acquisition and Data Quality Evaluation in Environmental Chemistry", *Anal. Chem.*, 52 (1978) 2242
- [11] Analytical Methods Committee, *Analyst*, 113 (1988) 1469
- [12] J. N. Miller, *Analyst*, 3 (1991) 116
- [13] L. Cuadros Rodríguez, A. M. García Campaña, C. Jiménez Linares, M. Román Ceba, *Anal. Lett.*, 28 (1993) 1243
- [14] A. Muñoz de la Peña, M. J. Gómez, F. Salinas, M. Sánchez-Peña, I. Durán Meras, *Talanta*, 40 (1993) 1657
- [15] W. Jin, Y. Wei, A. Xu, C. Liu, *Spectrochim. Acta*, 50A (1994) 1769

**III.B.- ESTUDIO ESPECTROFLUORIMÉTRICO DE LAS
FENILUREAS EN DISTINTOS MEDIOS**

III.B.1.- EN AUSENCIA DE MEDIOS ORGANIZADOS

III.B.2.- EN PRESENCIA DE CICLODEXTRINAS

III.B.2.- EN PRESENCIA DE MEDIOS MICELARES

III.B.1.- EN AUSENCIA DE MEDIOS ORGANIZADOS

III.B.1.1.- Elección del disolvente óptimo

III.B.1.2.- Espectros de excitación y emisión

III.B.1.3.- Estabilidad de las disoluciones

III.B.1.4.- Influencia del tiempo de irradiación

III.B.1.5.- Estabilidad de los fotoproductos

III.B.1.6.- Rectas de calibrado

III.B.1.6.1.- Ecuación de la recta de calibrado y parámetros estadísticos

III.B.1.6.2.- Parámetros de fiabilidad. Repetitividad

III.B.1.7.- Método operatorio

g Este Estudio fue presentado como Comunicación en el Congreso: "VIIIth International Symposium on Luminescence Spectrometry in Biomedical and Environmental Analysis-Detection Techniques and Applications in Chromatography and Capillary Electrophoresis", Las Palmas, España (1998). Título: "Analysis of phenylurea herbicides by photochemically-induced fluorescence spectrometry". Autores: M. Maafi, K. Taha-Bouamri, A. Bautista, J. J. Aaron, M. C. Mahedero, A. Muñoz de la Peña, F. Salinas. Comunicación: II-7

g También ha dado lugar al artículo: "Analysis of phenylurea herbicides by photochemically-induced fluorescence spectrometry", M. Maafi, K. Taha-Bouamri, A. Bautista, J. J. Aaron, M. C. Mahedero, A. Muñoz de la Peña, F. Salinas, Biomed. Chromatogr., 13 (1999) 189-190.

Las fenilureas son compuestos con actividad herbicida que se emplean frecuentemente en terrenos, en los que se quiere evitar el crecimiento de malas hierbas, y en tratamientos de preemergencia. Dentro de esta familia de herbicidas, se han seleccionado Diurón (DN), I soproturón (I N), Linurón (LN) y Neburón (NN).

Sus disoluciones no muestran señal fluorescente a menos que sean irradiadas, originándose así los correspondientes fotoproductos, que van a ser los responsables de las propiedades fluorescentes que presenten las disoluciones.

Nuestro objetivo, en este Capítulo, no es el de caracterizar los diferentes fotoproductos formados a partir de cada fenilurea, sino que pretendemos aprovechar esta transformación, en especies fluorescentes, para poder detectarlas y determinarlas, sin profundizar en los mecanismos que dan lugar a estas foto-transformaciones.

III.B.1.1.- Elección del disolvente óptimo.

Para realizar el estudio de la influencia del medio sobre la señal de fluorescencia fotoinducida, se ensayaron los disolventes: agua, etanol, metanol, 2-propanol y acetonitrilo, así como sus mezclas acuosas.

En cada uno de los disolventes y mezclas señaladas, se preparó una disolución 1.0×10^{-6} M del herbicida en estudio. Una alícuota de esta disolución fue irradiada varios minutos a fin de originar la formación del fotoproducto. A continuación, se registraron los espectros de excitación y emisión para determinar las longitudes de onda de máxima excitación y emisión de cada herbicida en los disolventes a utilizar.

Fijadas las longitudes de onda, se realizó el estudio del tiempo de irradiación en cada uno de los medios. Para ello, una alícuota de la disolución madre fue irradiada tiempos sucesivos de 0 a 16 minutos, comprobando tras cada medida que las longitudes de onda prefijadas no variaban.

En la Figura III.B.1.1 se han representado las intensidades de fluorescencia que presenta LN en función del tiempo de irradiación, en distintos medios.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que en todos los medios estudiados, la presencia de agua produce una disminución de la señal de fluorescencia inducida, a la vez que requiere mayores tiempos de irradiación para alcanzar la señal máxima. Empleando etanol y metanol el aumento de la señal de fluorescencia es poco significativo, sin embargo, con 2-propanol y sus mezclas acuosas, se observa la máxima señal, necesitándose, además, tiempos de irradiación más cortos para obtenerla.

En cuanto a los tiempos de irradiación, se puede observar que la señal de fluorescencia aumenta a medida que lo hace el tiempo de irradiación, siendo máxima a los 6 min, salvo en el caso del medio ACN:agua (60:40), v/v que son necesarios 12 min de irradiación, y en etanol, que se necesitan 10. Por otra parte, en 2-propanol y sus mezclas acuosas, la señal de fluorescencia disminuye para irradiaciones superiores a 7 y 9 min, respectivamente. En el resto de los medios ensayados, la señal de fluorescencia, una vez alcanzado el valor máximo, permanece prácticamente constante.

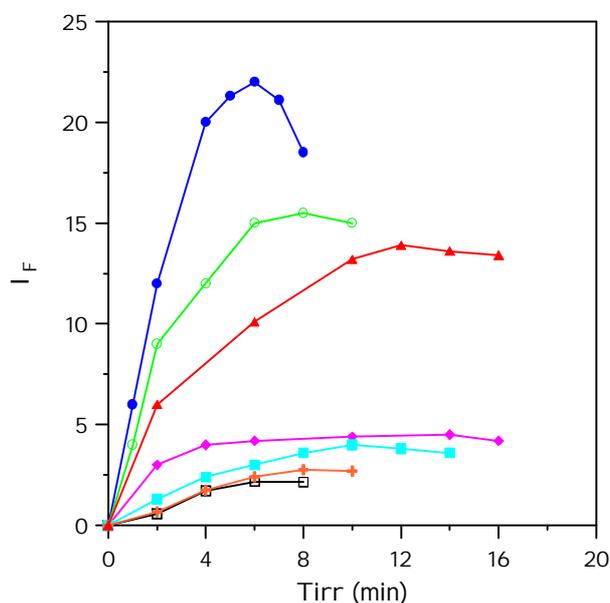


Figura III.B.1.1.- Influencia del tiempo de irradiación en la señal de fluorescencia de disoluciones 1.0×10^{-6} M de LN, en distintos disolventes. (●) 2-propanol; (○) 2-propanol:agua 90:10, v/v; (▲) acetonitrilo:agua 60:40, v/v; (◆) metanol; (■) etanol; (✚) etanol:agua 90:10, v/v; (□) agua.

Dado que el comportamiento de los otros herbicidas es similar, se decide tomar como disolvente el 2-propanol (2-PrOH) y sus mezclas acuosas por ser los que mayores señales de fluorescencia proporcionan.

III.B.1.2.- Espectros de excitación y emisión

En las condiciones fijadas en la Tabla III.B.1.1, se registraron los espectros de excitación y emisión de disoluciones 5.0×10^{-6} M de cada uno de los herbicidas, tras ser irradiadas el tiempo indicado en cada caso.

Tabla III.B.1.1. - Tiempos de irradiación y longitudes de onda de excitación y emisión para cada uno de los herbicidas en los medios estudiados.

COMPUESTO	MEDIO 2-PrOH:H ₂ O	t _{irr} (min)	$\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ (nm)
Linurón	100	10	283/345
	90:10		y
	80:20		325/405
Diurón	100	15	312/420
	90:10		
	80:20		
Isoproturón	100	10	312/433
	90:10	10	309/435
	80:20	10	
Neburón	100	15	309/420
	90:10		
	80:20		

t_{irr}: tiempo de irradiación

Como se puede observar en la Tabla III.B.1.1, los máximos de excitación y emisión de cada compuesto no se alteran significativamente al variar la proporción de agua en el medio. Así, DN, IN y NN presentan un solo máximo de excitación y otro de emisión. El primero, en todos los casos está comprendido entre 309 y 312 nm, mientras que el de emisión se encuentra entre 420 y 435 nm. Para LN, se obtienen dos parejas de longitudes de onda de excitación y emisión, que se muestran en la Figura III.B.1.2, junto con los espectros de excitación y emisión de los otros herbicidas en medio 100 % propanólico.

Para hacer más fácil la visualización de las gráficas, a cada uno de los herbicidas se le asignará un color:

Linurón (—) Longitud de onda de excitación de 283 nm, (—) Longitud de onda de excitación de 325 nm, Isoproturón (—), Diurón (—), Neburón (—).

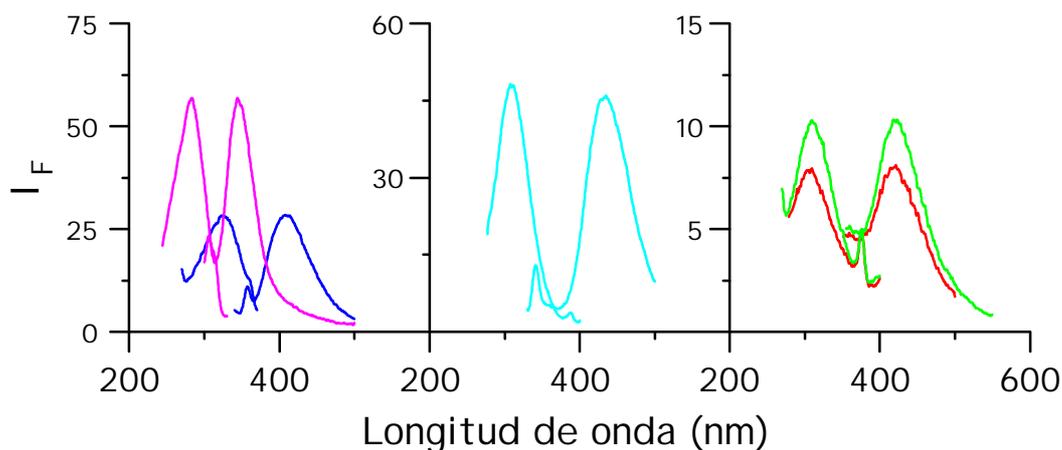


Figura III.B.1.2.- Espectros de excitación y emisión de los herbicidas en medio 2-PrOH 100%.

III.B.1.3.- Estabilidad de las disoluciones

Los estudios realizados hasta este punto pusieron de manifiesto la sensibilidad de las disoluciones de fenilureas a la luz, por lo que antes de continuar el estudio, se realizaron una serie de experiencias de cara a discernir si las soluciones madres de los herbicidas son adecuadamente estables o han de ser preparadas diariamente. En los estudios realizados se emplearon disoluciones propanólicas y mezclas hidropropanólicas de cada uno de ellos. En todos los casos se procedió empleando una disolución madre de cada herbicida 5.0×10^{-3} M, en 2-PrOH. Por dilución exacta se prepararon muestras 5.0×10^{-6} M en medio propanólico o hidropropanólico y se realizó el estudio de la influencia del tiempo de irradiación cuyo resultado se representa en

la Figura III.B.1.3.

Estos estudios fueron llevados a cabo partiendo de la disolución madre recién preparada (!) y de la misma disolución uno (") y dos días después (Q) de su preparación.

Como se puede observar en la Figura III.B.1.3, en todos los pesticidas y disolventes estudiados, los tiempos a los que se alcanza la máxima señal permanecen fijos e independientes de que la disolución sea reciente o ya lleve tiempo preparada. Las disoluciones 100 % propanólicas de IN y LN presentan una intensidad de fluorescencia inducida que disminuye con el transcurso de los días o permanece prácticamente constante, en el caso de DN. Las disminuciones más acusadas tuvieron lugar en las primeras 24 horas. Respecto a NN, en medio propanólico presenta un aumento de la señal de fluorescencia con el transcurso de los días, más acusado en las 24 horas iniciales. En medio 2-PrOH:H₂O (90:10, v/v), este aumento es muy poco significativo, mientras que con un contenido del 20 % se produce una disminución de la señal con el tiempo.

Las disoluciones con contenidos de agua del 10 % de los pesticidas DN e IN tienen un comportamiento, en función del tiempo, similar al descrito para las disoluciones propanólicas: se produce una disminución de la señal fluorescente a medida que aumenta el tiempo transcurrido desde la preparación de las disoluciones. Salvo en el caso de las disoluciones de IN que llevan 2 días preparadas, las cuales experimentan un aumento de la señal respecto a las disoluciones preparadas el día anterior.

En las disoluciones de LN, con contenidos de agua del 10 %, se produce una

disminución de la señal con el transcurso de los días, mientras que cuando las disoluciones contienen un 20 % de agua, se produce el efecto contrario, un aumento de la señal de fluorescencia.

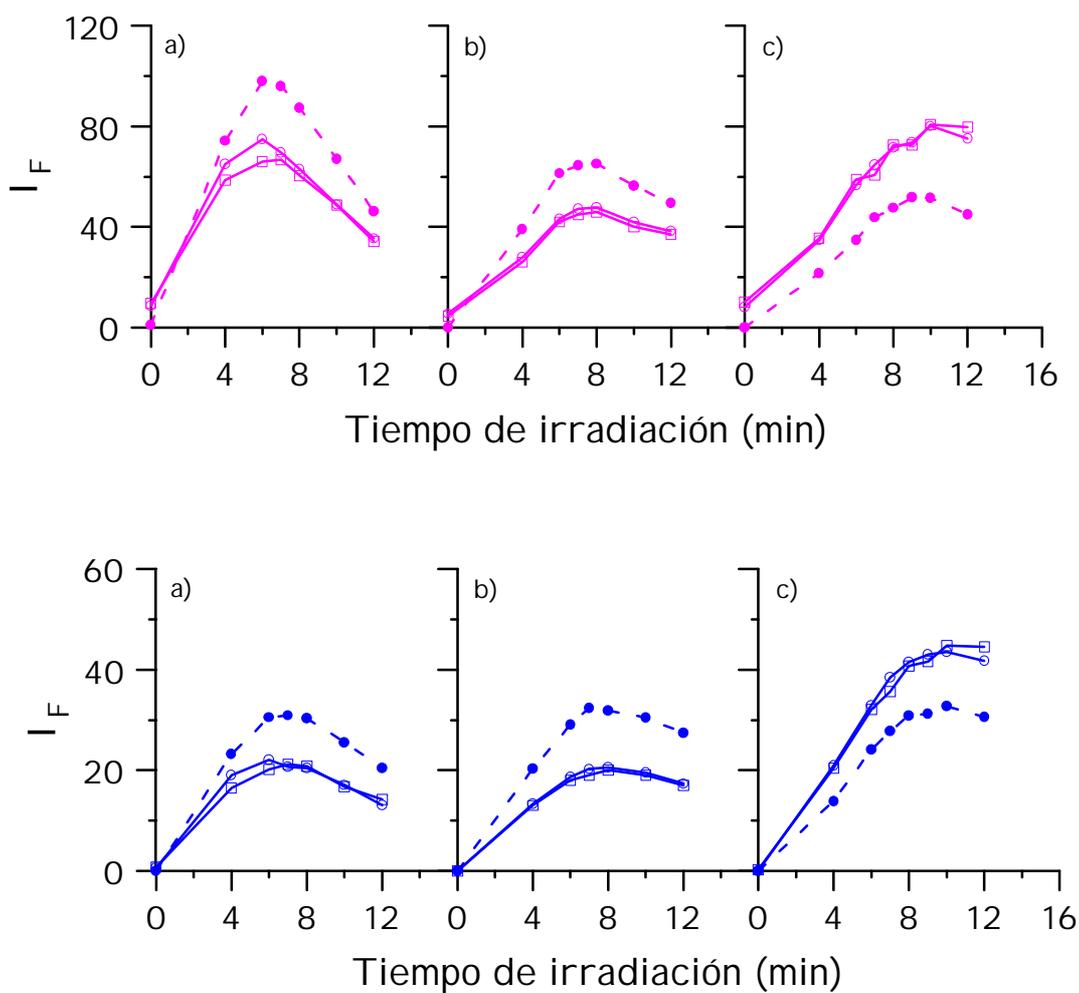


Figura III.B.1.3.- Influencia del tiempo de irradiación en la señal de fluorescencia de LN a $\lambda_{exc} = 283\text{ nm}$ (---) y $\lambda_{exc} = 325\text{ nm}$ (—).

a) 2-PrOH 100 %, b) 2-PrOH:H₂O (90:10), v/v, c) 2-PrOH:H₂O (80:20), v/v.

! ---! Disolución recién preparada

"—" Transcurrido 1 día desde su preparación

Q—Q Transcurridos 2 días desde su preparación

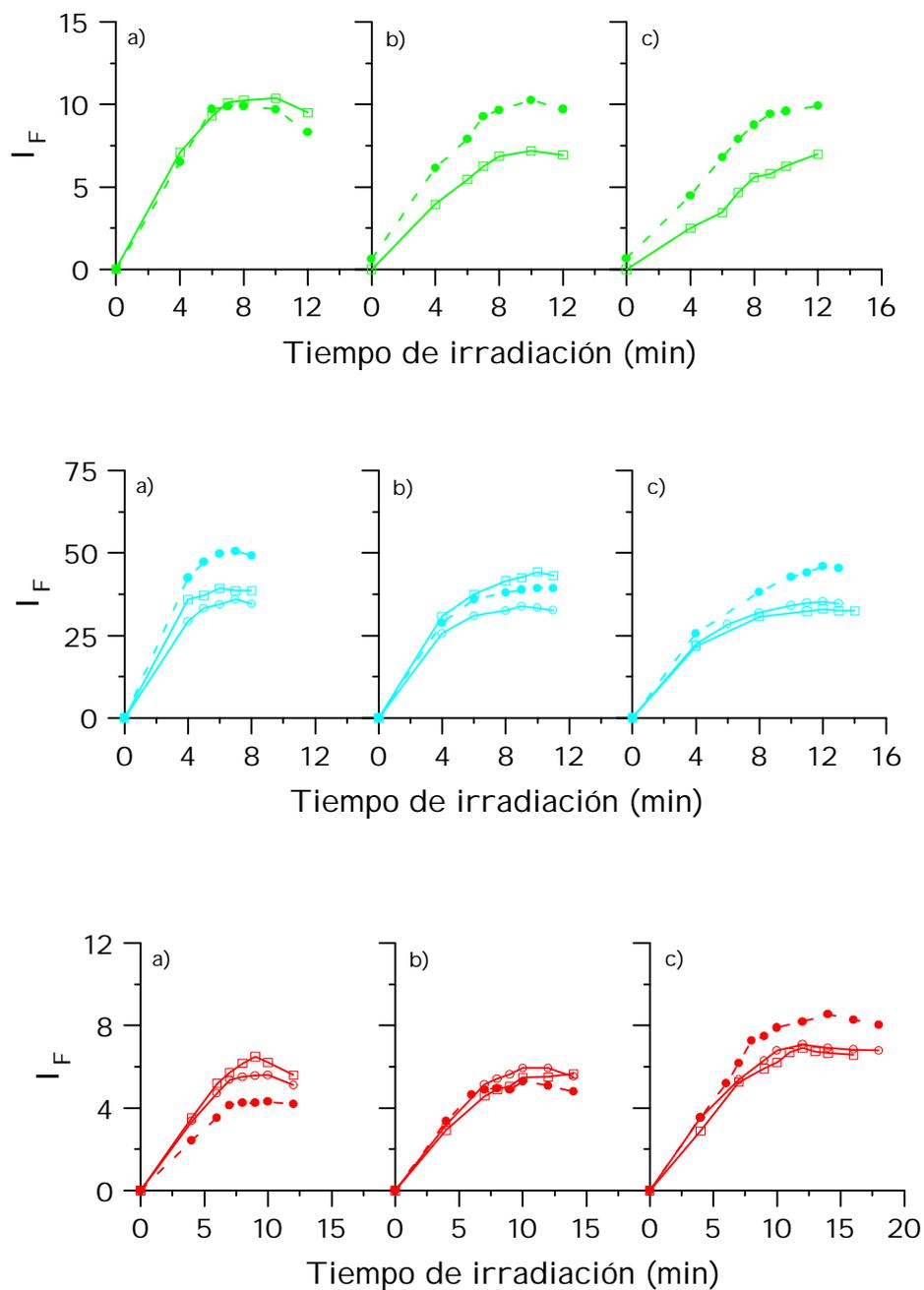


Figura III.B.1.3 (Cont). - Influencia del tiempo de irradiación en la señal de fluorescencia de **DN**, **IN** y **NN**.

a) 2-PrOH 100 %, b) 2-PrOH:H₂O (90:10), v/v, c) 2-PrOH:H₂O (80:20), v/v.

! ---! Disolución recién preparada

"—" Transcurrido 1 día desde su preparación

Q—Q Transcurridos 2 días desde su preparación

A la vista de los resultados obtenidos, concluimos, de acuerdo con la bibliografía, que es importante la protección de la luz de las soluciones madre, puesto que en todos los casos encontramos diferencias significativas de señales. Por ello, para experiencias posteriores se trabajará siempre con disoluciones madre recién preparadas y protegidas de la luz, para lo cual se protegerán los matraces con papel de aluminio.

III.B.1.4.- Influencia del tiempo de irradiación

Una vez elegido el 2-PrOH o sus mezclas acuosas como disolvente, partiendo de disoluciones madre recién preparadas de pesticida, se prepararon en cada caso las correspondientes diluidas y se estudió la influencia del tiempo de irradiación en la señal de fluorescencia.

Para ello, en una cubeta de cuarzo, una vez registrado el primer espectro de emisión a tiempo de irradiación cero ($t_{irr} = 0$), se irradió la muestra durante 4 minutos y se le registró el espectro de emisión de fluorescencia. A continuación, se repitieron irradiaciones sucesivas. Los resultados obtenidos se representan en la Figura III.B.1.4 y se resumen en la Tabla III.B.1.2.

Se puede observar que los tiempos de irradiación óptimos se encuentran en todos los casos comprendidos entre 6 y 12 min. Asimismo, se comprueba que a medida que aumenta el contenido de agua en el medio, aumenta el tiempo de irradiación.

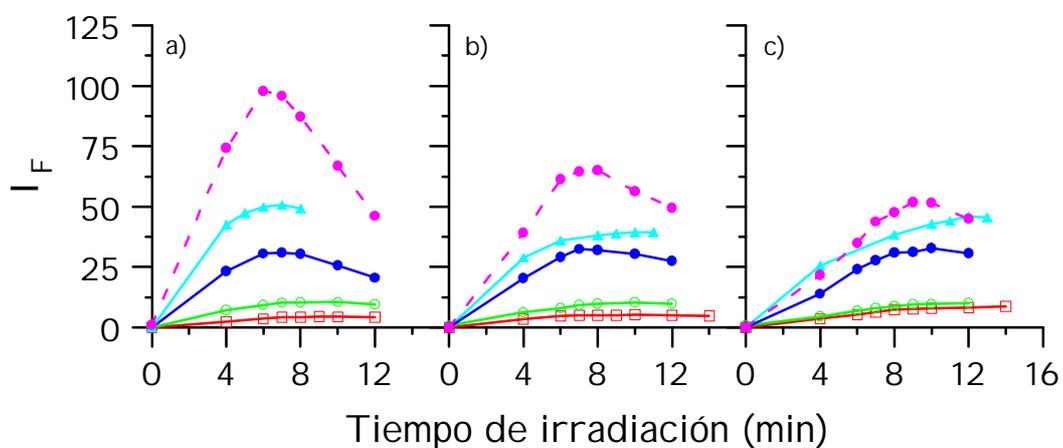


Figura III.B.1.4.- Influencia del tiempo de irradiación en la señal de fluorescencia para LN (!) a $\delta_{exc} = 283 \text{ nm}$ (- - -) y $\delta_{exc} = 325 \text{ nm}$ (—), DN ("), IN (•) y NN (Q).

a) 2-PrOH 100 %; b) 2-PrOH:H₂O (90:10), v/v ; c) 2-PrOH:H₂O (80:20), v/v.

Tabla III.B.1.2. - Tiempos de irradiación óptimos para cada herbicida en los medios ensayados.

COMPUESTO δ_{exc}/δ_{em} (nm)	2-PrOH (%)	t_{irr} óptimo (min)
Linurón 283/345 325/405	100	6
	90	7
	80	9
Diurón 312/420	100	8
	90	9
	80	11

COMPUESTO $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ (nm)	2-PrOH (%)	$t_{irr\acute{o}ptimo}$ (min)
Isoproturón 312/433* 309/435**	100	6
	90	9
	80	12
Neburón 309/420	100	8
	90	10
	80	12

*100 % 2-PrOH

** 10 y 20 % 2-PrOH

Se puede observar que los tiempos de irradiación óptimos se encuentran en todos los casos comprendidos entre 6 y 12 min. Asimismo, se comprueba que a medida que aumenta el contenido de agua en el medio, aumenta el tiempo de irradiación.

III.B.1.5.- Estabilidad de los fotoproductos

A fin de estudiar la estabilidad de la señal de fluorescencia del fotoproducto en función del tiempo, se planteó una experiencia en la que una vez preparada la disolución de herbicida 5.0×10^{-6} M y depositada una alícuota en la cubeta de cuarzo, ésta fue irradiada el tiempo óptimo de cada herbicida. A continuación, se registró el espectro de emisión registrado a intervalos de tiempo crecientes hasta un total de una hora.

En las Figuras III.B.1.5-6 se muestra la evolución que experimenta la señal PI F de los fotoproductos originados, en función del tiempo. También se observa que, en todos los casos, se produce un ligerísimo aumento de la señal de fluorescencia en los primeros minutos, para luego permanecer estable. En el caso de LN, excitando a 283

nm, este aumento se produce transcurridos 5 min, mientras que en los otros casos, tiene lugar transcurrido el primer minuto desde su irradiación.

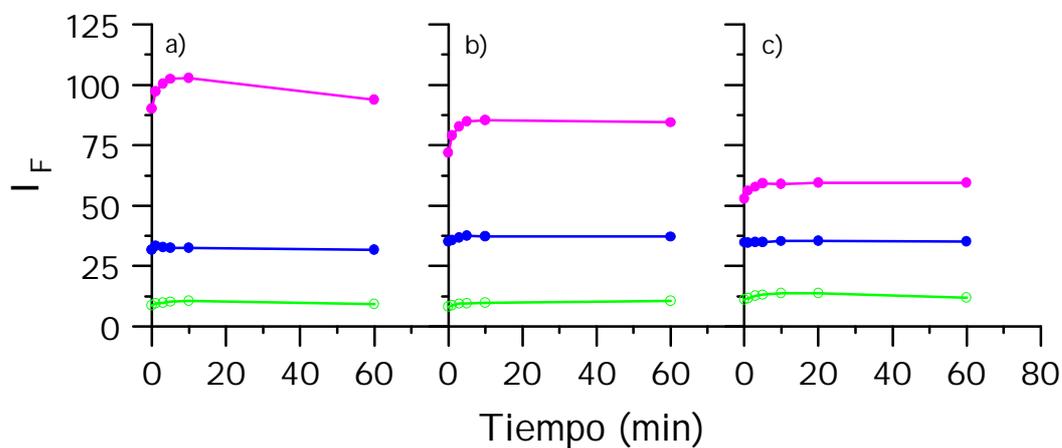


Figura III.B.1.5.- Estabilidad del fotoproducto formado al irradiar las soluciones de LN, [(\bullet) λ_{exc} = 283 nm, (\bullet) λ_{exc} = 325 nm] y DN (\circ).

a) 2-PrOH 100 %; b) 2-PrOH:H₂O (90:10), v/v; c) 2-PrOH:H₂O (80:20), v/v.

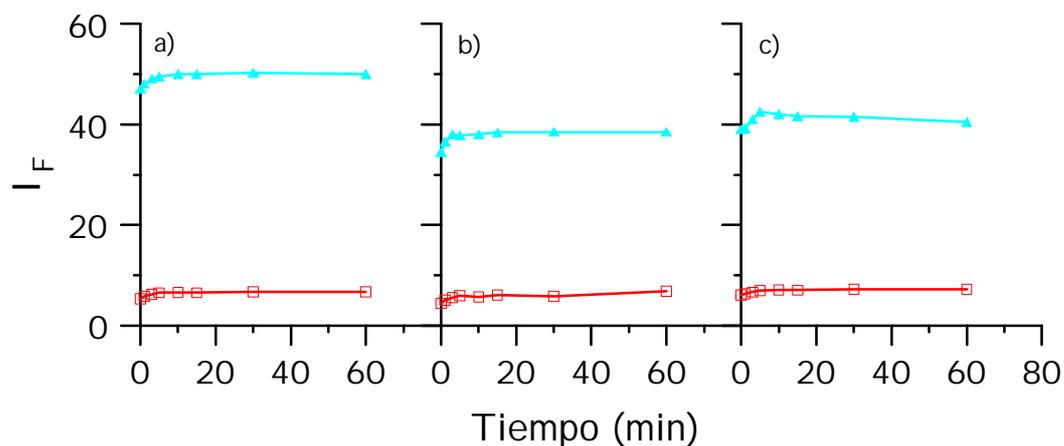


Figura III.B.1.6 .- Estabilidad del fotoproducto formado al irradiar las soluciones de LN (\bullet) y NN (\circ).

a) 2-PrOH 100 %; b) 2-PrOH:H₂O (90:10), v/v; c) 2-PrOH:H₂O (80:20), v/v.

En experiencias posteriores y para obtener una reproducibilidad adecuada se realizaron las medidas una vez transcurrido 1 min desde la irradiación. La longitud de onda de excitación que se empleará para LN no será la de 283 nm que requiere un tiempo de espera de unos 5 min, antes de realizar la medida, sino la de 325 nm, que sólo necesita de 1 min de espera antes de medir.

Este aumento de la señal en los primeros minutos, puede atribuirse a que cuando las disoluciones son irradiadas se produce un aumento de la temperatura, con lo cual, cuando se introduce la cubeta en el espectrofluorímetro, termostataado a 20 °C, se necesita un determinado tiempo para que las disoluciones alcancen una temperatura estable, de ahí que observemos esas alteraciones en la señal.

Asimismo, se realizó una experiencia encaminada a comprobar si la formación del fotoproducto transcurre de la misma forma cuando la muestra es irradiada su tiempo óptimo de irradiación de forma continua o discontinua. En ese sentido, se prepararon muestras independientes de LN, DN, IN y NN, en medio 100 % propanólico, que fueron irradiadas durante 6, 8, 6, y 8 min, respectivamente, correspondientes a los tiempos óptimos de irradiación de los herbicidas. Se registraron sus espectros de emisión y se observó que las señales de fluorescencia obtenidas eran similares a las encontradas cuando la experiencia era llevada a cabo irradiando disoluciones cada 2 min hasta completar el tiempo óptimo de irradiación.

III.B.1.6.- Rectas de calibrado

Una vez optimizadas las condiciones operatorias, procedimos al establecimiento de las rectas de calibrado. Estas fueron establecidas en medio 2-PrOH y en sus mezclas acuosas al 10 y 20 %. En la Tabla III.B.1.3 se recogen las

longitudes de onda de excitación y emisión, así como los tiempos de irradiación empleados, en cada medio. En el caso del herbicida LN, como ya se ha indicado, las rectas de calibrado se han establecido empleando 325 y 405 nm como las longitudes de onda de excitación y emisión, respectivamente.

Las muestras fueron preparadas por triplicado y medidas frente a un blanco, preparado en idénticas condiciones, con las siguientes condiciones instrumentales:

- Sensibilidad = 800 V
- Rendijas = 4 nm
- Velocidad de barrido = 350 nm/min
- T^a de trabajo = 20 °C

Tabla III.B.1.3.- Condiciones óptimas de trabajo.

COMPUESTO	$\lambda_{exc} / \lambda_{em}$ (nm)	$t_{irr.}^{op}$ (min)	Alcohol (%)
Linurón	325/405	6	100
		7	90
		9	80
Diurón	312/420	8	100
		9	90
		11	80
Isoproturón	312/433 309/435	6	100
		9	90
		12	80
Neburón	309/420	8	100
		10	90
		12	80

III.B.1.6.1.- Ecuación de la recta de calibrado y parámetros estadísticos

En las Figuras III.B.1.7-8 se representan las rectas de calibrado de los herbicidas en cada uno de los medios, recogiendo en las Tablas III.B.1.4 - 6 los datos estadísticos de las mismas.

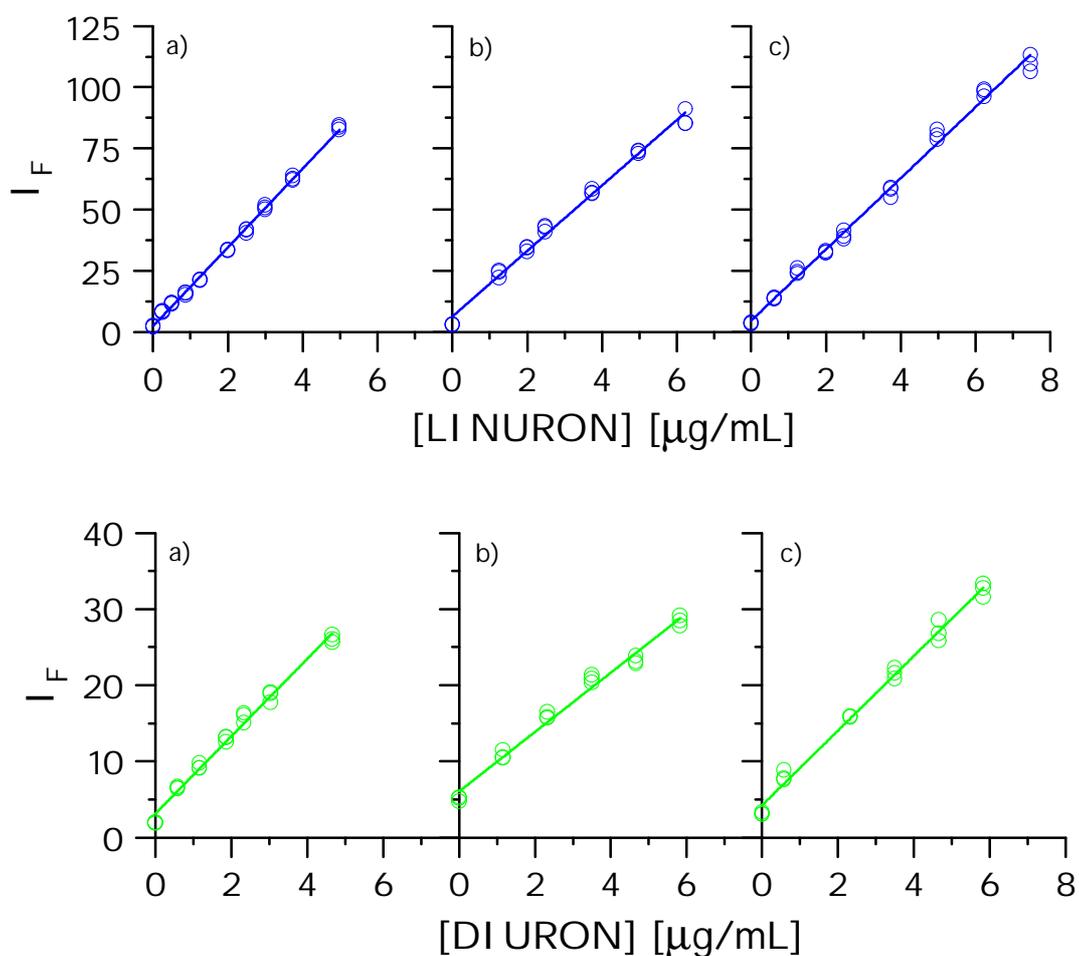


Figura III.B.1.7.- Rectas de calibrado correspondientes a LN (!) y DN (").

- a) 2-PrOH 100 %
- b) 2-PrOH:H₂O (90:10), v/v
- c) 2-PrOH:H₂O (80:20), v/v

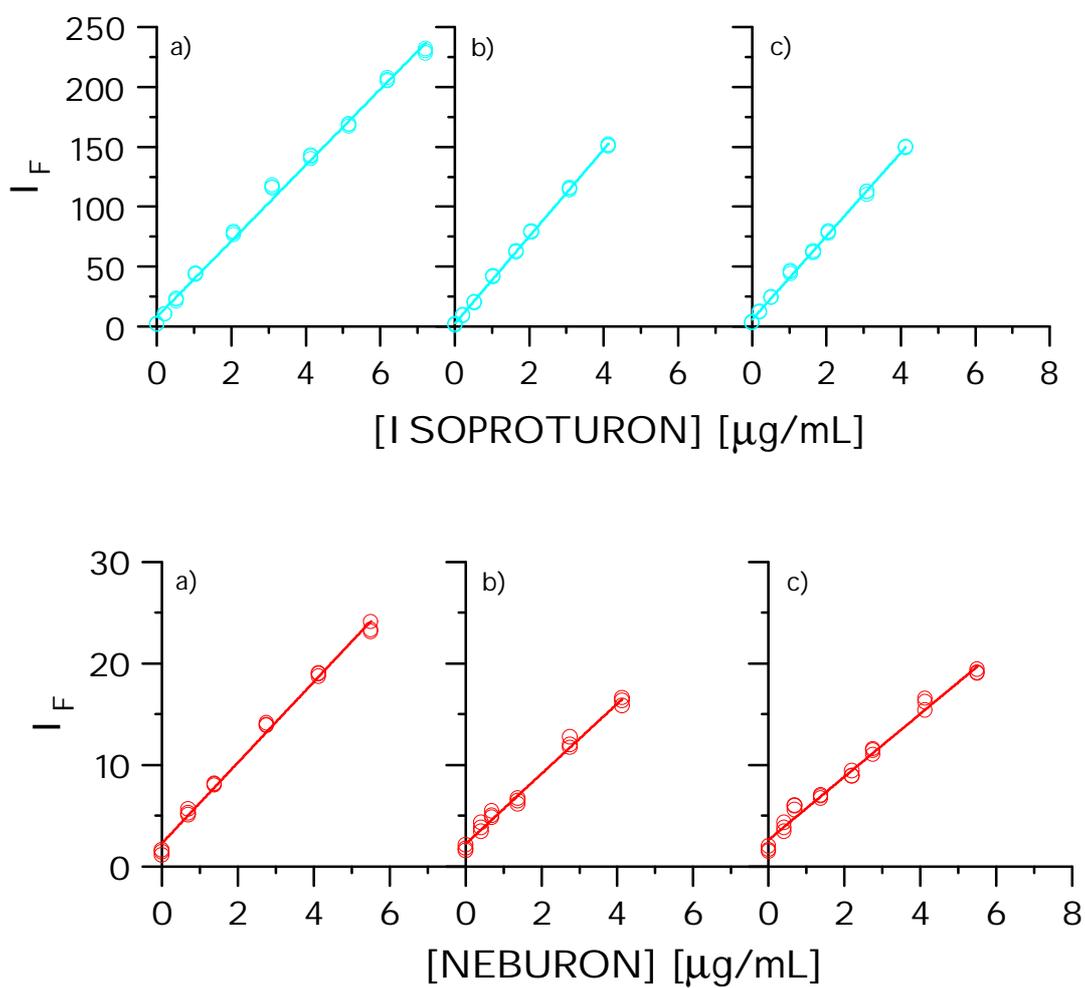


Figura III.B.1.8.- Rectas de calibrado correspondientes a IN (•) y NN (Q).

a) 2-PrOH 100 %

- b) 2-PrOH:H₂O (90:10), v/v
 c) 2-PrOH:H₂O (80:20), v/v.

Tabla III.B.1.4.- Datos estadísticos obtenidos para [Linurón](#).

	100 %	90:10	80:20
Ordenada en el origen: a	1,85	6,26	4,58
Desviación estándar de a: s _a	0,34	0,95	0,86
Desviación estándar relativa de a: DER (a) (%)	18,24	15,18	18,75
Pendiente: b	16,26	13,4	14,54
Desviación estándar de b: s _b	0,13	0,27	0,21
Desviación estándar relativa de b: DER (b) (%)	0,80	0,20	1,47
Desviación estándar de regresión: s _{y,x}	1,03	2,44	2,71
Coefficiente de correlación: r	0,999	0,996	0,997
Coefficiente de determinación: r ²	0,998	0,992	0,994

Tabla III.B.1.5.- Datos estadísticos obtenidos para [Diurón](#).

	100 %	90:10	80:20
Ordenada en el origen: a	3,14	6,05	4,30
Desviación estándar de a: s_a	0,29	0,41	0,38
Desviación estándar relativa de a: DER (a) (%)	9,38	6,80	8,87
Pendiente: b	5,08	3,90	4,90
Desviación estándar de b: s_b	1,02	0,12	0,11
Desviación estándar relativa de b: DER (b) (%)	2,38	3,00	2,18
Desviación estándar de regresión: $s_{y,x}$	0,81	0,98	0,95
Coefficiente de correlación: r	0,995	0,993	0,996
Coefficiente de determinación: r^2	0,990	0,986	0,992

Tabla III.B.1.6.- Datos estadísticos de la recta de calibrado de [Isoproturón](#).

	100 %	90:10	80:20
Ordenada en el origen: a	9,52	2,48	5,65
Desviación estándar de a: s_a	1,79	0,43	0,62
Desviación estándar relativa de a: DER (a) (%)	18,84	17,11	10,98
Pendiente: b	31,4	36,32	34,86
Desviación estándar de b: s_b	0,44	0,20	0,30
Desviación estándar relativa de b: DER (b) (%)	1,40	0,56	0,85
Desviación estándar de regresión: $s_{y,x}$	5,56	1,36	1,98
Coefficiente de correlación: r	0,997	0,999	0,999
Coefficiente de determinación r^2	0,994	0,998	0,998

Tabla III.B.1.7.- Datos estadísticos de la recta de calibrado de [Neburón](#).

	100 %	90:10	80:20
Ordenada en el origen: a	2,30	2,21	3,10
Desviación estándar de a: s_a	0,25	0,19	0,09
Desviación estándar relativa de a: DER (a) (%)	10,79	8,58	2,84
Pendiente: b	3,97	3,45	2,65
Desviación estándar de b: s_b	0,08	0,09	0,06
Desviación estándar relativa b: DER (b) (%)	2,02	2,58	9,91
Desviación estándar de regresión: $s_{y,x}$	0,66	0,55	0,72
Coefficiente de correlación: r	0,997	0,995	0,992
Coefficiente de determinación r^2	0,994	0,99	0,984

III.B.1.6.2. Parámetros de fiabilidad. Repetitividad

Para el cálculo del límite de detección, se ha utilizado el criterio de Clayton, así como el de Winefordner y Long. La estimación de todos los parámetros analíticos del método, calculados a partir del modelo de regresión, que utiliza los datos del calibrado, se reúne en las Tablas III.B.1.8-11.

Tabla III.B.1.8. - Parámetros de fiabilidad aplicando el modelo de regresión lineal para [Linurón](#).

	100 %	90:10	80:20
Linealidad (1- DER (b)) %	99,2	98,01	98,53
Sensibilidad analítica (\therefore g mL ⁻¹)	0,06	0,18	0,19
Desviación estándar del blanco	0,04	0,13	0,12
Límite de determinación (\therefore g mL ⁻¹)	0,42	1,29	1,23
LD, Clayton (\therefore g mL ⁻¹)	0,14	0,44	0,42

	100 %	90:10	80:20
LD, Winefordner y Long (: g mL^{-1})	0,06	0,21	0,18

Tabla III.B.1.9.- Parámetros de fiabilidad aplicando el modelo de regresión lineal para Diurón.

	100 %	90:10	80:20
Linealidad (1-DER (b)) %	97,62	97,01	97,82
Sensibilidad analítica (: g mL^{-1})	0,16	0,25	0,19
Desviación estándar del blanco	0,11	0,18	0,14
Límite de determinación (: g mL^{-1})	1,11	1,84	1,38
LD, Clayton (: g mL^{-1})	0,38	0,63	0,47
LD, Winefordner y Long (: g mL^{-1})	0,18	0,35	0,24

Tabla III.B.1.10.- Parámetros de fiabilidad aplicando el modelo de regresión lineal para Isoproturón.

	100 %	90:10	80:20
Linealidad (1-DER (b)) %	98,59	99,44	99,15
Sensibilidad analítica (: g mL^{-1})	0,18	0,37	0,57
Desviación estándar del blanco	0,12	0,02	0,04
Límite de determinación (: g mL^{-1})	1,19	0,25	0,38
LD, Clayton (: g mL^{-1})	0,40	0,08	0,13
LD, Winefordner y Long (: g mL^{-1})	0,15	0,04	0,05

Tabla III.B.1.11.- Parámetros de fiabilidad aplicando el modelo de regresión lineal para el **Neburón**.

	100 %	90:10	80:20
Linealidad (1-DER (b)) %	97,97	97,42	97,16
Sensibilidad analítica (∴ g mL ⁻¹)	0,17	0,16	0,23
Desviación estándar del blanco	0,12	0,11	0,16
Límite de determinación (∴ g mL ⁻¹)	1,12	1,08	1,63
LD, Clayton (∴ g mL ⁻¹)	0,40	0,37	0,56
LD, Winefordner y Long (∴ g mL ⁻¹)	0,19	0,17	0,22

A continuación, en las Figuras III.B.1.9-10 se representan las variaciones de la precisión del método en función de la concentración.

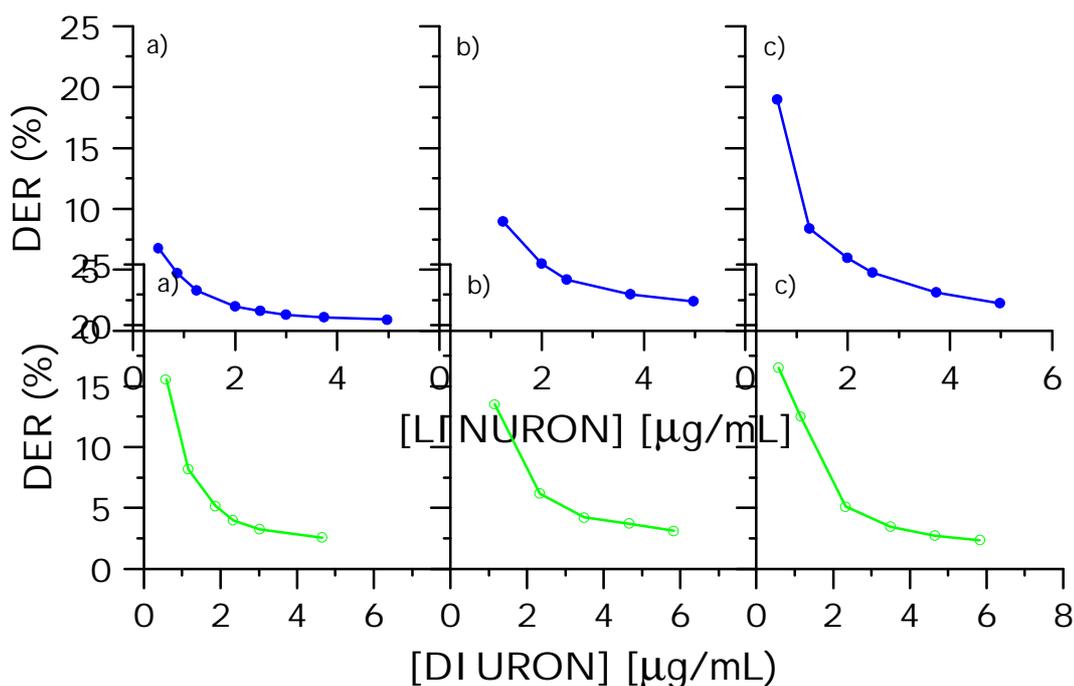


Figura III.B.1.9.- Desviaciones estándar relativas correspondientes a LN (!) y DN (").

a) 2-PrOH 100 %

b) 2-PrOH:H₂O (90:10), v/v

c) 2-PrOH:H₂O (80:20), v/v

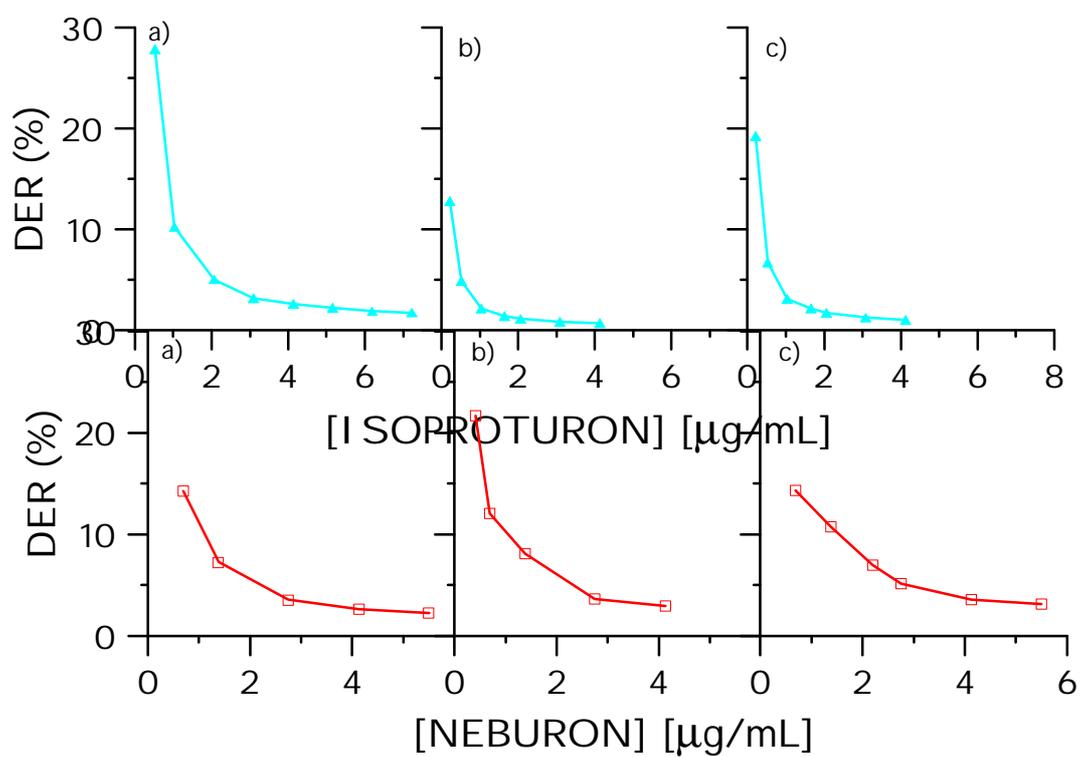


Figura III.B.1.10. - Desviaciones estándar relativas correspondientes a **IN** (•) y **NN (Q)**.

- a) 2-PrOH 100 %
- b) 2-PrOH:H₂O (90:10), v/v
- c) 2-PrOH:H₂O (80:20), v/v

III.B.1.7.- Método operatorio

Como consecuencia del estudio realizado se propone el siguiente método operatorio. En matraces de 10.00 mL se introducen volúmenes crecientes de herbicida para que su concentración final esté comprendida dentro del rango de aplicación de cada método. Se adiciona el volumen de agua necesario para fijar el contenido de ésta en el medio y se enrasa con 2-PrOH. De forma análoga se prepara el blanco. Alícuotas de estos patrones son irradiadas el tiempo optimizado y se realizan las medidas de intensidad de fluorescencia, a las longitudes de onda de excitación y emisión adecuadas.

En la Tabla III.B.1.12 se resumen los rangos de aplicación, longitudes de onda de excitación/emisión y los tiempos de irradiación a emplear con cada pesticida.

Tabla III.B.1.12.- Método operatorio.

COMPUESTO	Medio % 2-PrOH	Rango (: g mL ⁻¹)	$\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ (nm)	t _{irr} óptimo (min)
Linurón	100	0,42 - 5,00	325/405	6
	90	1,29 - 6,20		7
	80	1,23 - 7,50		9
Diurón	100	1,11 - 4,70	312/420	8
	90	1,84 - 5,80		9
	80	1,38 - 5,80		11
Isoproturón	100	1,19 - 7,20	312/433	6
	90	0,25 - 4,10	309/435	9
	80	0,38 - 4,10		12
Neburón	100	1,12 - 5,50	309/420	8
	90	1,08 - 4,10		10
	80	1,63 - 5,50		12

El uso de disolventes orgánicos limita bastante la aplicabilidad del método, de ahí que a continuación, se haga un estudio completo del comportamiento que presentan estas especies cuando se emplean medios acuosos exclusivamente. Nuestra elección se centra en los medios organizados, ya sean ciclodextrinas o medios micelares.

III.B.2.- ESTUDIO ESPECTROFLUORIMÉTRICO DE LOS COMPLEJOS DE INCLUSIÓN QUE FORMAN LAS FENILUREAS CON HIDROXIPROPIL- β -CD Y γ -CD

III.B.2.1.- Espectros de excitación y emisión

III.B.2.2.- Estabilidad de las disoluciones

III.B.2.3.- Influencia del tiempo de irradiación

III.B.2.4.- Influencia del pH

III.B.2.5.- Estabilidad de los fotoproductos

III.B.2.6.- Rectas de calibrado

III.B.2.6.1.- Ecuación de la recta de calibrado y parámetros estadísticos

III.B.2.6.2.- Parámetros de fiabilidad. Repetitividad

III.B.2.7.- Aplicación del método a la determinación de estas fenilureas en agua

III.B.2.7.1.- Tratamiento de la muestra

III.B.2.7.2.- Extracción en fase sólida

III.B.2.7.3.- Recuperaciones

III.B.2.8.- Método operatorio

III.B.2.9.- Determinación de la estequiometría y constante de formación del complejo de inclusión entre los herbicidas y las ciclodextrinas

III.B.2.9.1.- Fundamento teórico

III.B.2.9.2.- Influencia de la concentración de ciclodextrina

III.B.2.9.3.- Cálculo de las estequiometrías y constantes de inclusión de los complejos formados

III.B.2.10.- Bibliografía

g Este Estudio fue presentado como Comunicación en el Congreso: "IXth International Symposium on Luminescence Spectrometry in Biomedical and Environmental Analysis Spectroscopic and imaging Detection Techniques", Montpellier, Francia (2000). Título: "Photochemically-induced fluorimetric determination of phenylurea herbicides by inclusion in cyclodextrins". Autores: M. C. Mahedero, A. Muñoz de la Peña, A. Bautista-Sanchez and J. J. Aaron. Comunicación: p. 45

Dicha comunicación fue publicada como resumen extendido en un número especial, dedicado al Congreso, en la revista Luminescence,15 (2000) 103-104.

g También ha dado lugar al artículo:

"An investigation of inclusion complexes of cyclodextrins with phenylurea herbicides by photochemically-induced fluorescence. Analytical Applications", M. C. Mahedero, A. Muñoz de la Peña, A. Bautista-Sánchez, J. J. Aaron, J. Inclusion Phenom. Mol. Recog. Chem., (2001), (en prensa)

III.B.2.1.- Espectros de excitación y emisión

Los herbicidas objeto de este estudio son Diurón (DN), Linurón (LN), I soproturón (IN) y Neburón (NN).

Se prepararon disoluciones acuosas 5.0×10^{-5} M de dichos herbicidas, manteniendo constantes concentraciones de 1.0×10^{-2} M de β -ciclodextrina (β -CD) o HP- β -ciclodextrina (HP- β -CD). Dichas disoluciones se sometieron a irradiación UV durante un tiempo en el que, en ensayos preliminares, se había comprobado la formación de fotoproducto, al observarse un aumento de la señal de fluorescencia. Los espectros se registraron fijando las rendijas de excitación y emisión en 4 nm, una velocidad de barrido de 350 nm/min y un voltaje de 800 V. En la Tabla III.B.2.1 y Figura III.B.2.1 se recogen y representan los resultados obtenidos.

Tabla III.B.2.1.- Longitudes de onda de excitación/emisión y tiempos de irradiación de cada uno de los compuestos en los dos medios organizados.

Compuesto	$\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ (nm)	t_{irr} (min)
LN: β -CD	321/357	15
LN:HP- β -CD	321/357	10
DN: β -CD	316/358	7
DN:HP- β -CD	315/358	7
IN: β -CD	302/437	20
IN:HP- β -CD	302/436	15
NN: β -CD	319/358	15
NN:HP- β -CD	315/359	12

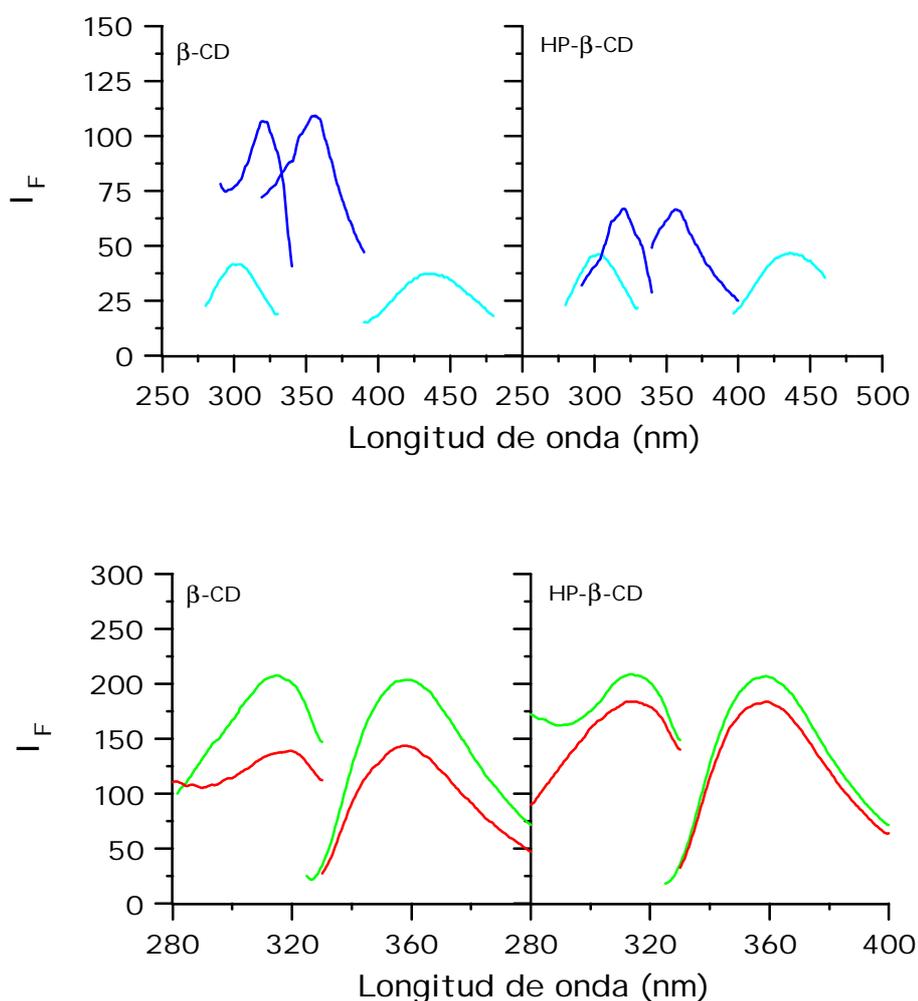


Figura III.B.2.1.- Espectros de excitación y emisión de los herbicidas en presencia de β -CD y HP- β -CD. LN, DN, GN y NN.

Los resultados obtenidos muestran que en todos los casos los complejos de inclusión formados, tanto con β -CD como con HP- β -CD, presentan un solo máximo de excitación y de emisión, no observándose diferencias espectrales entre los complejos formados por un herbicida con una u otra de las ciclodextrinas. Los complejos de LN presentan máximos de excitación a 321 nm mientras que los de DN y NN se fijan a 316 nm, siendo en todos los casos 357 nm la longitud de onda de máxima emisión. Por

su parte, los complejos formados por IN presentan los máximos de excitación y emisión a 302 y 437 nm, respectivamente.

III.B.2.2. - Estabilidad de las disoluciones de herbicidas

Como ya se ha comprobado, las fenilureas son fotosensibles [1] por lo que es necesario evitar cualquier tipo de exposición a la luz; para ello, tanto las disoluciones madre como las preparadas a partir de éstas se conservan en recipientes de color topacio.

Con el fin de comprobar la estabilidad de las disoluciones de los herbicidas, se prepararon, para cada uno de ellos, dos disoluciones con una concentración de herbicida 5.0×10^{-5} M y de la correspondiente ciclodextrina 1.0×10^{-2} M. A una de las disoluciones, recién preparada, se le registra el espectro de emisión, empleando como longitud de onda de excitación la de su fotoproducto. A continuación, se irradia en la cubeta de medida durante periodos de tiempo sucesivos, registrando el espectro de emisión tras cada irradiación. La misma experiencia se lleva a cabo con la segunda disolución pero trascurridas 24 h desde su preparación.

En la Figura III.B.2.2, se han representado los resultados obtenidos con la disolución de complejo NN:HP- β -CD.

De manera similar a los resultados mostrados en dicha Figura, en todos los herbicidas se observa que, para las disoluciones que se irradian trascurridas 24 h desde su preparación, la señal de fluorescencia sufre una ligera disminución, más acentuada a medida que se irradia la disolución, manteniéndose fijas las longitudes de onda de excitación y emisión. Estos hechos sugieren una cierta inestabilidad de

la disolución inicial, que justificaría una menor formación de fotoproducto o una degradación del fotoproducto formado, con respecto a los resultados que se obtienen al irradiar disoluciones recién preparadas, por lo que para experiencias posteriores se trabajará con disoluciones recién preparadas.

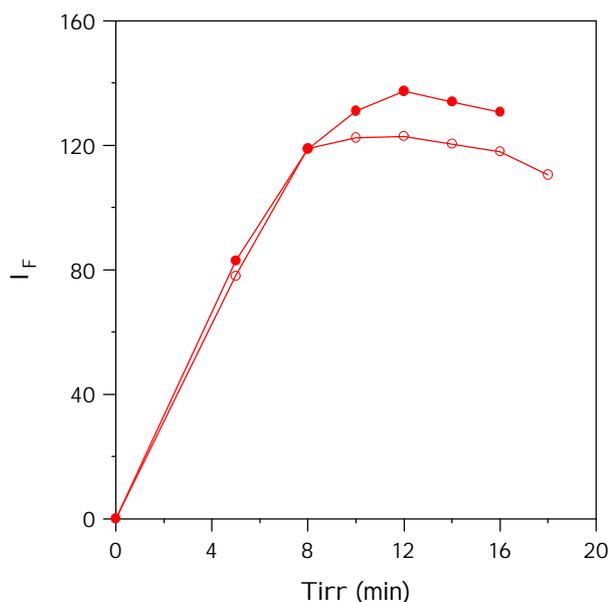


Figura III.B.2.2.- Influencia del tiempo de irradiación sobre la señal de fluorescencia de una disolución de NN:HP- β -CD, recién preparada (I) y trascurridas 24 horas desde su preparación (II).

III.B.2.3.- Influencia del tiempo de irradiación

Para estudiar la influencia del tiempo de irradiación en la señal de fluorescencia inducida, se prepararon muestras en tubos desechables de 5.00 mL, manteniendo constantes, en todos ellos, una concentración final de β -CD o HP- β -CD de 1.0×10^{-2} M y una concentración de pesticida de 5.0×10^{-5} M.

Una vez preparadas cada una de las disoluciones, se les registró el espectro de emisión, fijando la excitación a la longitud de onda de máxima excitación de su fotoproducto. A continuación, se irradió la muestra en la cubeta durante tiempos sucesivos, registrando el espectro de emisión tras cada periodo de irradiación.

En la Figura III.B.2.3 se han representado las intensidades de fluorescencia, medidas a la λ_{em} del correspondiente fotoproducto, en función del tiempo de irradiación. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que en el caso de DN, LN y NN, la señal de fluorescencia aumenta rápidamente con el tiempo de irradiación hasta alcanzar un valor máximo a los 20 min, para LN y entre 8 y 12 min, para NN y DN.

Irradiaciones superiores a 25 min, en el caso de LN, ó 12 min, para NN y DN, originan una disminución de la señal de fluorescencia.

El comportamiento del fotoproducto que origina IN es similar a los anteriores, es decir, a medida que aumenta el tiempo de irradiación aumenta, lentamente, la señal de fluorescencia, y no se alcanza una señal máxima tras 60 min de irradiación.

Con relación a la ciclodextrina empleada en la formación del complejo, se observa que las señales de los complejos de DN, IN y NN, son independientes de la ciclodextrina que forma el complejo, obteniéndose señales muy similares. Es en el caso de LN, donde se aprecia una mayor diferencia ya que el fotoproducto del complejo formado con HP- β -CD es menos fluorescente que el formado con β -CD, a la vez que el tiempo óptimo de irradiación es mayor en el primero, 20 min, que en este último, 30 min.

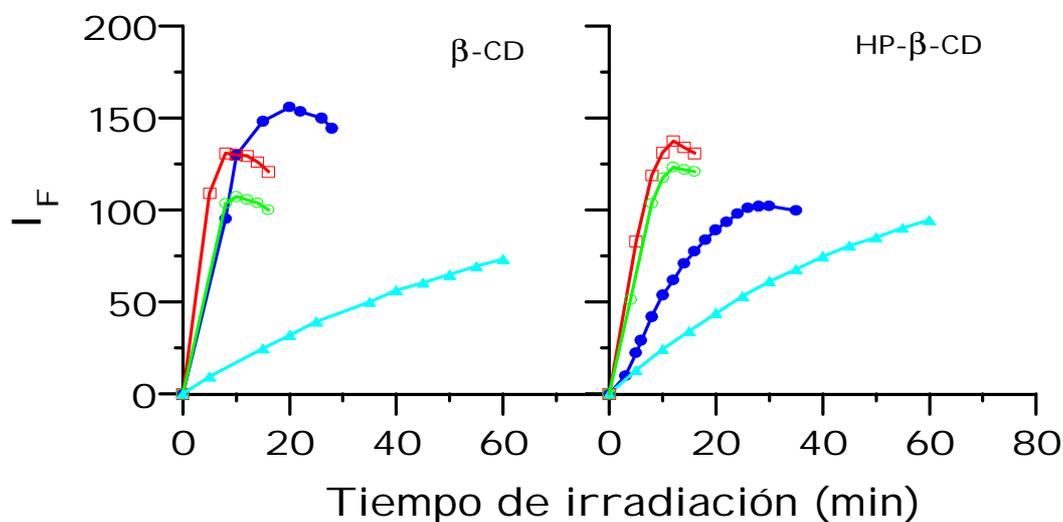


Figura III.B.2.3.- Influencia del tiempo de irradiación en la señal de fluorescencia en los dos medios estudiados (β -CD y HP- β -CD).

(▲) LN, (▲) DN, (●) IN y (■) NN.

III.B.2.4.- Influencia del pH

Inicialmente se realizó una experiencia para comprobar la hidrólisis que estos compuestos sufren en medio ácido y básico [2,3], observándose que dicha hidrólisis a pH 2 y 9 conlleva una pérdida considerable o total de la señal de fluorescencia. En estas condiciones, se estudió la influencia del tiempo de irradiación sobre la señal de fluorescencia de disoluciones de complejo sin tamponar, pH 6.0 - 6.5, y tamponadas a pH 5 y pH 7.

Para ello, se prepararon muestras en tubos desechables de 5.00 mL, que contenían 2.5 mL de HP- β -CD, 2.0×10^{-2} M, o bien 3.5 mL de β -CD 1.4×10^{-2} M (en ambos casos la concentración final en el tubo es de 1.0×10^{-2} M), 1.0 mL de la

disolución reguladora de pH correspondiente, 20% (v/v) y 0.05 mL de herbicida de concentración 5.0×10^{-3} M en 2-PrOH, siendo la concentración final de 5.0×10^{-5} M.

En las Figuras III.B.2.4-5 se muestran las gráficas correspondientes a la experiencia realizada.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que los complejos DN:\$-CD y DN:HP-\$-CD, presentan una intensidad de fluorescencia similar, siendo máxima la que corresponde a sus disoluciones no tamponadas y mínima a las de pH 7. Los tiempos de irradiación óptimos son de 7-8 min para el complejo DN:\$-CD y 10-12 para DN:HP-\$-CD.

Con relación a los complejos formados por LN presentan máxima señal de fluorescencia en medio no tamponado o de pH 5, dándose una pérdida de fluorescencia a pH 7 más significativa en el complejo formado con \$-CD. Con relación al tiempo óptimo de irradiación, este no varía con el pH, siendo de 20 min para el complejo con \$-CD y de 25 min con HP-\$-CD. Por último, el complejo formado con \$-CD presenta un mayor aumento de la señal de fluorescencia inducida.

El complejo NN: \$-CD presenta máxima señal en medio no tamponado y mínima a pH 7, siendo los tiempos de irradiación óptimos de 8 y 6 min, para medio no tamponado y pH 7, respectivamente, y de 12 min, a pH 5.

Por su parte, el complejo NN:HP-\$-CD presenta máxima señal en medio no tamponado y mínima a pH 5. El tiempo de irradiación menor, 8 min, es el correspondiente a pH 7, siendo de 12 min para medio no tamponado y pH 5.

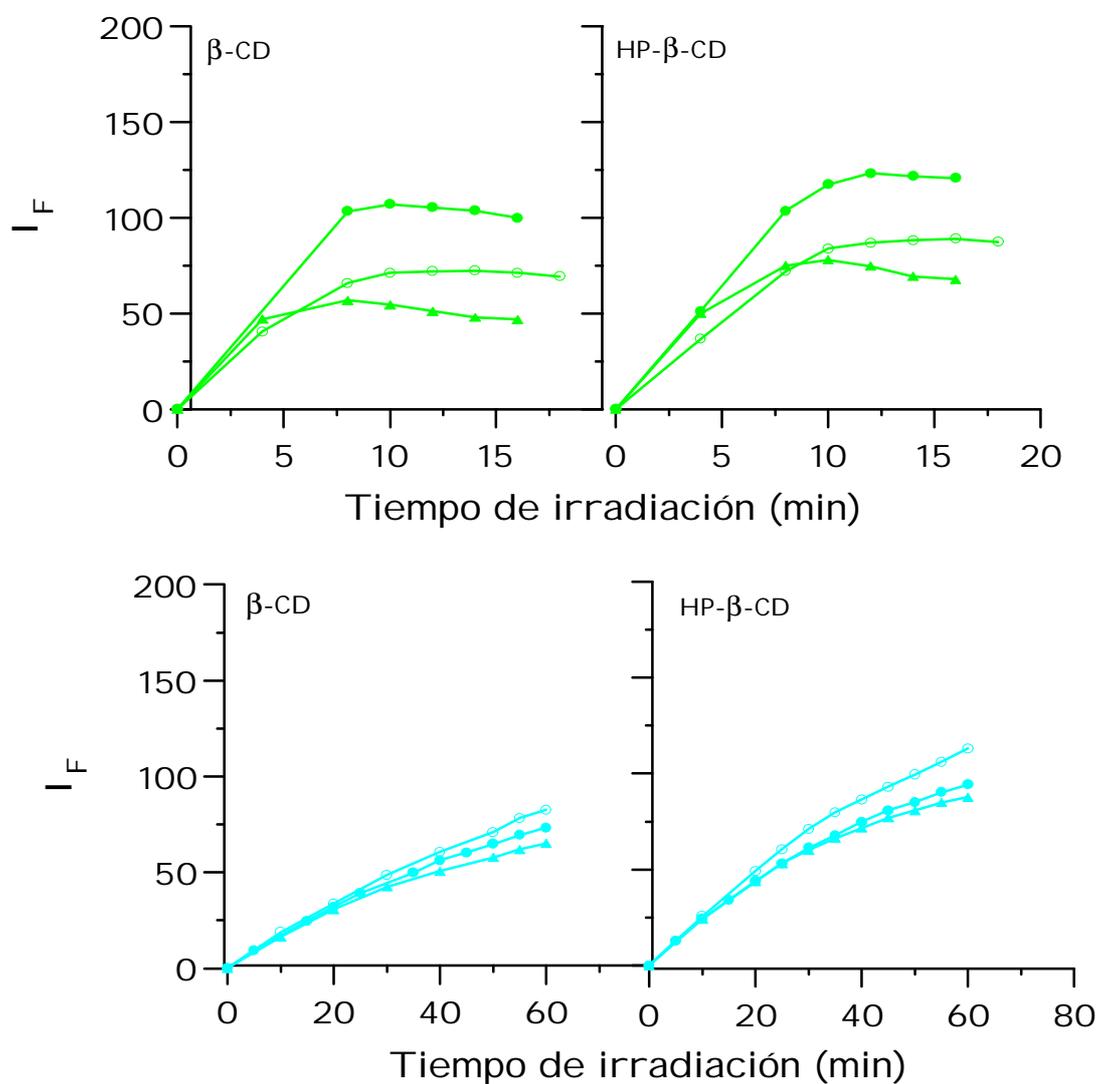


Figura III.B.2.4.- Influencia del pH en la señal PIF de DN e IN.

(○) sin tampón

(□) tampón de pH =5

(●) tampón de pH = 7

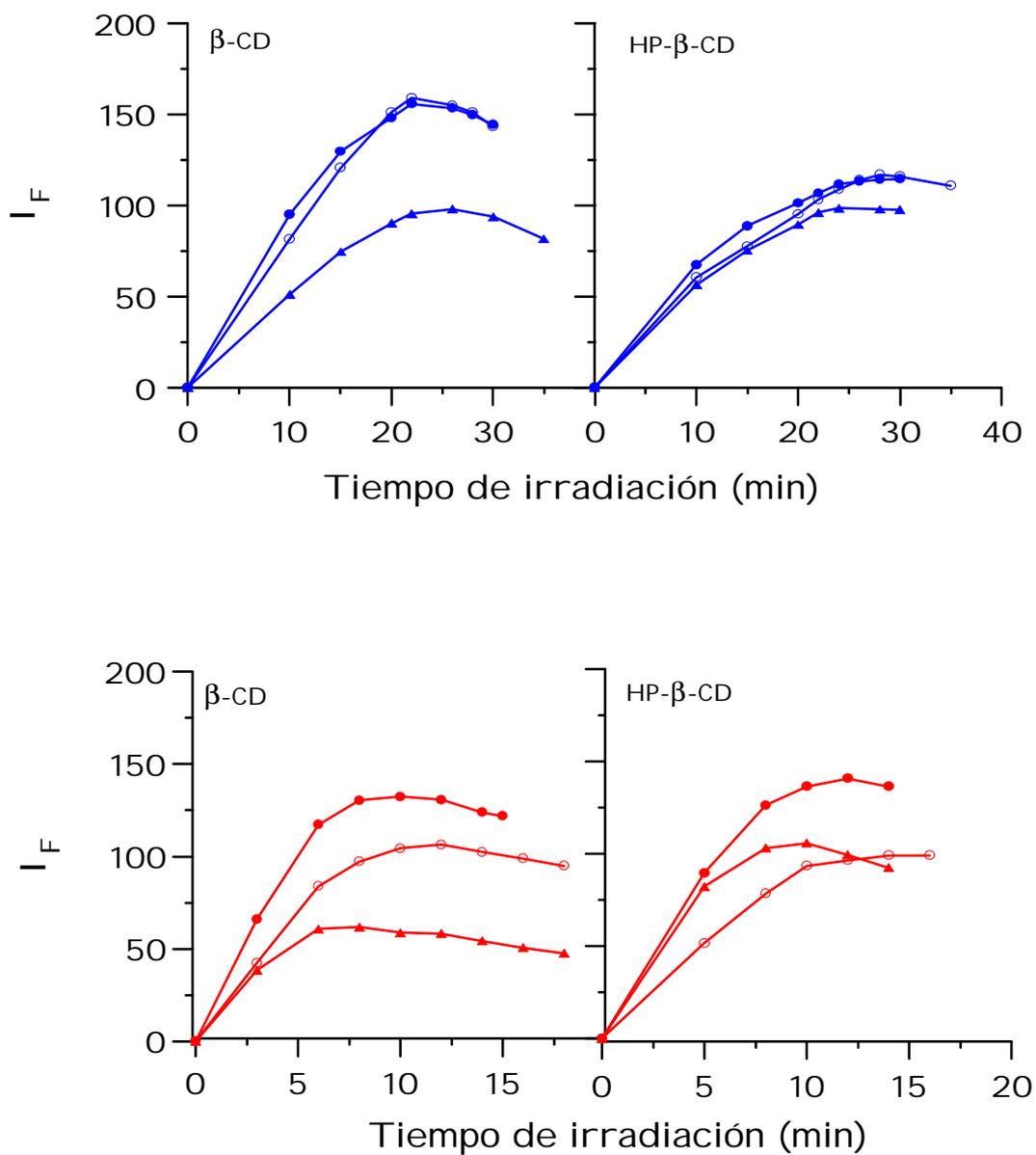


Figura III.B.2.5.- Influencia del pH en la señal PIF de LN y NN.

(○) sin tampón

(○) tampón de pH =5

(●) tampón de pH = 7

Por último, cabe señalar que los complejos de IN, en todos los casos, presentan comportamiento similar, no alcanzándose señal máxima tras 65 min de irradiación por lo que no se continuará su estudio, dado que este tiempo de irradiación tan elevado, hace inviable, desde el punto de vista práctico, la utilización analítica de la fotorreacción.

En la Tabla III.B.2.2 se recogen las variables optimizadas, junto con las longitudes de onda de excitación y emisión, los tiempos óptimos de irradiación y las señales de fluorescencia obtenidas en estas condiciones. Asimismo, se han señalado, **en negrita**, las condiciones operatorias elegidas para establecer las rectas de calibrado.

Hay que indicar que, aunque en muchos casos la mejor señal se obtiene en medios no tamponados, siempre se elige el que contiene tampón, con objeto de poder realizar aplicaciones analíticas del método puesto a punto, sobre muestras reales.

Tabla III.B.2.2. - Condiciones operatorias y señales obtenidas en distintos medios.

Compuesto	Medio ^a	$\lambda_{exc} / \lambda_{em}$ (nm)	t_{irr}^{opt} (min) ^a	I_F
Linurón	HP-\$-CD (sin tampón)	321 / 357	24	111.8
	HP-\$-CD (pH=5)	321 / 357	26	113.9
	HP-\$-CD (pH=7)	321 / 357	24	98.4
	\$-CD (sin tampón)	321 / 356	22	155.8
	\$-CD (pH=5)	321 / 356	22	159.1
	\$-CD (pH=7)	321 / 356	22	95.5
Diurón	HP-\$-CD (sin tampón)	315 / 358	12	123.2
	HP-\$-CD (pH=5)	317 / 356	12	86.8
	HP-\$-CD (pH=7)	313 / 362	10	78.1
	\$-CD (sin tampón)	316 / 358	10	107.2
	\$-CD (pH=5)	318 / 356	10	71.2
	\$-CD (pH=7)	318 / 356	8	56.8
Neburón	HP-\$-CD (sin tampón)	315 / 359	10	136.4
	HP-\$-CD (pH=5)	319 / 357	10	93.4
	HP-\$-CD (pH=7)	319 / 359	8	105.7
	\$-CD (sin tampón)	319 / 358	8	130.4
	\$-CD (pH=5)	319 / 358	10	104.4
	\$-CD (pH=7)	319 / 358	6	60.8
Isoproturón	HP-\$-CD (sin tampón)	302 / 436	>60	-
	HP-\$-CD (pH=5)	302 / 436	"	-
	HP-\$-CD (pH=7)	302 / 436	"	-
	\$-CD (sin tampón)	302 / 437	"	-
	\$-CD (pH=5)	302 / 437	"	-
	\$-CD (pH=7)	302 / 437	"	-

^a Tiempo óptimo de irradiación

III.B.2.5.- Estabilidad de los fotoproductos

Antes de establecer las correspondientes rectas de calibrado, y en las condiciones elegidas como óptimas, se comprobó la estabilidad de los fotoproductos formados tras la irradiación.

Se realizó la experiencia con cada uno de los complejos que forman los herbicidas, tanto con S-CD como con HP-S-CD . Para ello se prepararon disoluciones de éstos y se irradiaron los tiempos optimizados, realizándose, a continuación, la medida de la señal de fluorescencia inducida. La disolución se guardó protegida de la luz y se volvió a medir la señal a lo largo de una hora, comprobándose que ésta permanece prácticamente constante durante dicho tiempo. Con ello se demuestra que una vez formados los fotoproductos éstos permanecen estables durante tiempo más que suficiente para realizar las medidas.

Al igual que sucediera en medios no organizados, inicialmente la señal del fotoproducto es menor que transcurridos de 1-2 minutos, tiempo necesario para que la señal se estabilice una vez conseguida la temperatura ambiente de la disolución, gracias al baño termostático acoplado al fluorímetro. Para evitar irreproducibilidades, todas las medidas se realizarán transcurrido 1 minuto desde la irradiación de las disoluciones.

III.B.2.6.- Rectas de calibrado

En las condiciones fijadas como óptimas, se procedió al establecimiento de las rectas de calibrado de cada uno de los herbicidas. Para ello, se prepararon, por triplicado, muestras conteniendo concentraciones crecientes de herbicida, por

adición de los volúmenes adecuados de su disolución 5.0×10^{-3} M, en 2-PrOH. A continuación, se añade 1.00 mL del tampón adecuado, lo que supone un 20 % (v/v), el volumen necesario de ciclodextrina, para que su concentración final sea de 1.0×10^{-2} M, y agua ultrapura hasta enrase. De forma análoga se preparan los blancos y se registran los espectros de emisión empleando como condiciones instrumentales:

- Sensibilidad = 800 V
- Rendijas = 4 nm
- Velocidad de barrido = 350 nm/ min
- T^a de trabajo = 20 °C

III.B.2.6.1.- Ecuación de la recta de calibrado y parámetros estadísticos

Los resultados obtenidos se representan en la Figura III.B.2.6 y en la Tabla III.B.2.3 se recogen los valores de los parámetros estadísticos calculados a partir de las rectas de calibrado, empleando el programa Alamin [4].

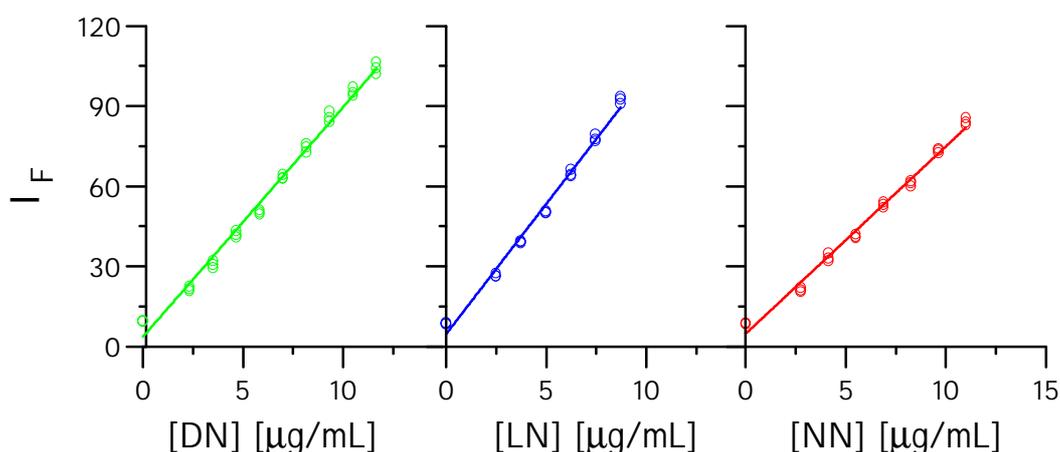


Figura III.B.2.6. - Rectas de calibrado.

Tabla III.B.2.3. - Parámetros estadísticos obtenidos en calibración univariante.

	Diurón	Linurón	Neburón
Ordenada en el origen: a	3,7	4,7	4,8
Desviación estándar de a : s_a	1,1	1,2	1,0
Desviación estándar relativa de a : $DER (a) (%)$	30	25	20
Pendiente: b	8,59	9,72	7,01
Desviación estándar de b : s_b	0,15	0,21	0,14
Desviación estándar relativa de b : $DER (b) (%)$	1,8	2,1	2,0
Desviación estándar de regresión: $s_{y,x}$	2,94	2,65	2,37
Coefficiente de correlación: r	0,996	0,996	0,996
Coefficiente de determinación: r^2	0,991	0,991	0,991

III.B.2.6.2. - Parámetros de fiabilidad. Repetitividad

Estos parámetros han sido obtenidos de la experiencia del calibrado, reuniéndose en la Tabla III.B.2.4.

Tabla III.B.2.4. - Parámetros de fiabilidad aplicando el modelo de regresión lineal

	Diurón	Linurón	Neburón
Linealidad (1- $DER (b) (%)$)	98,24	97,86	97,99
Sensibilidad analítica ($\therefore g mL^{-1}$)	0,34	0,27	0,34
Desviación estándar del blanco	0,23	0,19	0,23
Límite de determinación ($\therefore g mL^{-1}$)	2,29	1,93	2,35
LD, Clayton ($\therefore g mL^{-1}$)	0,77	0,66	0,8
LD, Winefordner y Long ($\therefore g mL^{-1}$)	0,38	0,32	0,43

En la Figura III.B.2.7 se representan los valores de precisión para cada valor de concentración empleado en el calibrado.

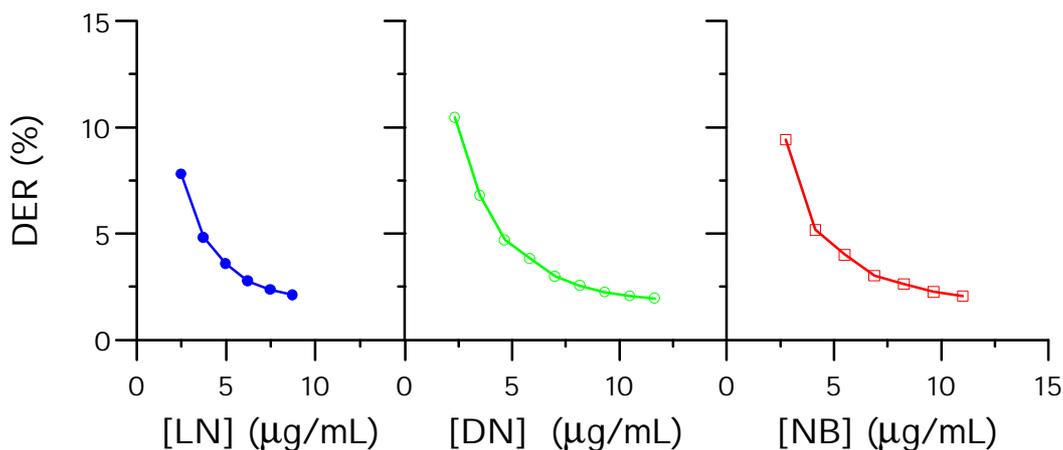


Figura III.B.2.7.- Desviaciones estándar relativas de cada herbicida.

III.B.2.7.- Aplicación del método propuesto a la determinación de las fenilureas en agua

La gran cantidad de herbicidas que se aplican actualmente en la agricultura contribuyen a la presencia de sustancias tóxicas en aguas superficiales o subterráneas, y posteriormente, en las de consumo humano. Además, en los últimos tiempos también han sido usados con fines no agrícolas, tal es el caso de Diurón, que se ha empleado en carreteras, autopistas, ferrocarriles y campos de golf; también ha sido empleado como agente antisuciedad en las pinturas de los barcos [5]. Estos herbicidas, al ser solubles en agua, pueden pasar fácilmente del suelo a los cereales y entrar a formar parte de la cadena alimenticia, afectando al hombre.

Así, se ha comprobado que el isoproturón es detectado incluso 1 año después de haber sido esparcido en el suelo [6]. Dependiendo además de la pluviosidad de las zonas y de las propiedades del suelo, los herbicidas pueden pasar a las aguas subterráneas, donde, debido a la ausencia de actividad microbiana, los procesos de degradación son lentos y el fenómeno de acumulación puede fácilmente conducir a niveles tóxicos [7]. También se ha descrito en la literatura que concentraciones de fenilureas del orden de 1 g mL^{-1} , afectan al desarrollo embrionario y neonatal de algunos peces e invertebrados acuáticos [8].

Aunque la Comisión de la Comunidad Europea indica que la máxima cantidad de herbicida, en agua potable, no debe exceder de 0.1 g L^{-1} , si es un solo compuesto, o de 0.5 g L^{-1} , si es una mezcla de ellos; no se ha dicho nada de las cantidades permitidas o prohibidas en las aguas superficiales, sin embargo, algunos autores afirman que no se debieran sobrepasar los 30 g L^{-1} [9].

El agua está considerada como el bien máspreciado de nuestros recursos naturales. En las zonas rurales, el agua de los pozos es a menudo la única fuente de obtención de agua con la calidad aceptable para el consumo humano, sin tratamiento previo. Pero, ésta puede ser contaminada por los desechos domésticos, industriales y agrícolas, entre los que se incluyen los fertilizantes y herbicidas [10-12].

Podemos considerar cuatro causas por las que el agua se puede contaminar de pesticidas [13]:

- Tratamientos de pesticidas en zonas agrícolas, que pueden generar una contaminación en las aguas superiores a los 10 g L^{-1} .
- Aguas de enjuague contaminadas con pesticidas procedentes de

contenedores y equipos de espolvoreo: 0.01-0.1 : g L⁻¹.

- Aguas de desecho procedentes de la industria agrícola: 0.01-0.1 : g L⁻¹.

- Aguas de desecho procedentes de las plantas dedicadas a la formulación y manufactura de pesticidas: 0.001-1.0 : g L⁻¹.

III.B.2.7.1.- Tratamiento de la muestra

El método ha sido aplicado al agua del río Guadiana, a su paso por la ciudad de Badajoz y la toma de muestra se llevó a cabo en frascos de cristal color topacio, previamente enjuagados con agua ultrapura. Las muestras fueron filtradas varias veces a través de filtros Whatman para eliminar la arena, limo y residuos varios que pudieran contener. Posteriormente, fueron almacenadas a 4 °C en el frigorífico hasta el momento de su análisis. El pH medido para el agua de río fue de 8.3.

Antes de efectuar la contaminación del agua, se filtró de nuevo a través de filtros de nylon Osmonic de 0.45 y 0.22 : m. En las muestras reales, no se encontró ningún residuo de pesticida en las condiciones establecidas por el método.

III.B.2.7.2.- Extracción en fase sólida

Con objeto de mejorar la sensibilidad para el análisis del agua, algunos autores utilizan un pretratamiento de las muestras, o pasos previos de preconcentración [14-16], que en nuestro caso será el de la extracción en fase sólida (SPE, Solid Phase Extraction). Este método consiste en hacer pasar la muestra de agua contaminada a través de un cartucho o Sep-Pak Plus C₁₈, previamente acondicionado con 8.0 mL de acetonitrilo y 8.0 mL de agua ultrapura, para activar las cadenas.

En este proceso se quedan retenidas las diferentes fenilureas y sustancias con carácter polar, que posteriormente serán eluidas con acetonitrilo. Antes de la

elución, es necesario "lavar" el Sep-Pak para eliminar las sustancias indeseables que pudieran quedar retenidas junto con los herbicidas objeto de estudio.

Se trabajó con 50 mL de agua de río, y se empleó un volumen de elución de 1.0 mL de acetonitrilo, con objeto de efectuar su evaporación en un tiempo razonable.

III.B.2.7.3.- Recuperaciones

Una vez comprobado que ninguna de estas aguas contenía residuos de los herbicidas estudiados, al menos en los niveles de concentración detectables por el método propuesto, se procedió al estudio de recuperación a varios niveles de concentración, para comprobar la exactitud del método.

Se llevó a cabo la experiencia tomando 50 mL de agua, enriqueciéndola con cantidades tales que la concentración final de herbicida fuese de 0.3, 0.6 y 0.88 : g mL⁻¹, para Diurón y Neburón y 0.3, 0.6 y 0.8 : g mL⁻¹, para Linurón. También se preparó un blanco sin la adición de ninguno de los herbicidas.

Par conseguir una preconcentración de los analitos de 10 veces, se sigue el siguiente procedimiento:

- Se acondiciona el cartucho con 8.0 mL de acetonitrilo y la misma cantidad de agua ultrapura, para estirar las cadenas C₁₈ que serán las encargadas de retener los analitos.

- Se pasan los 50 mL del agua contaminada a través del Sep-Pack o cartucho, a un flujo de 5 mL/min. Se ha de trabajar con precaución puesto que es recomendable que el Sep-Pak no se seque, tal y como indican algunos autores. [17,18]

- Se lava el cartucho con dos fracciones de agua ultrapura de 5.0 mL.

- Se pasan 5.0 mL de acetonitrilo:agua (1:4) v/v, para tratar de eliminar la

señal de fondo presente en las aguas.

- Por último, se eluyen los herbicidas con 1.0 mL de acetonitrilo, que se evapora a sequedad haciendo pasar un flujo de nitrógeno a través de la disolución. A continuación, se añade la ciclodextrina y el tampón correspondiente, así como el agua ultrapura hasta llegar a un volumen final de 5.0 mL, tal y como se propone en el método.

Las recuperaciones obtenidas para Diurón, Linurón y Neburón en las aguas del río Guadiana contaminadas, oscilaron entre el 81 y 103 %. Las desviaciones estándar relativas oscilaron entre 1 y 7 %, pero siempre por debajo del 30 %, de acuerdo con las reglas establecidas por la EPA (Agencia de Protección Medioambiental de Estados Unidos), que estipulan como aceptables valores de recuperaciones que están en el rango de 70 a 130 %, con una desviación estándar relativa de un máximo del 30 % [19]. Éstas fueron satisfactorias, encontrándose comprendidas entre un 81 y un 103 % (datos correspondientes a las medias).

III.B.2.8. - Método operatorio

Se propone el siguiente método operatorio: las muestras reales son tratadas como se ha descrito en la sección III.B.2.7.3.

Las rectas de calibrado se establecen preparando los correspondientes patrones en tubos desechables de 5.00 mL, en ellos se introducen volúmenes crecientes de herbicida para que su concentración final esté comprendida dentro del rango de aplicación del método. Seguidamente, se adiciona 1.0 mL de la disolución tampón correspondiente, el volumen necesario de ciclodextrina para que la concentración final de ésta sea de 1.0×10^{-2} M, y agua ultrapura hasta enrase. De

forma análoga se preparan los blancos. Alícuotas de estos patrones son irradiadas el tiempo optimizado y se realizan las medidas de intensidad de fluorescencia, a las longitudes de onda de excitación y emisión adecuadas.

En la tabla III.B.2.5 se resumen los rangos de aplicación, longitudes de onda de excitación y emisión y los tiempos de irradiación a emplear con cada pesticida.

Tabla III.B.2.5. - Método operatorio.

COMPUESTO	Medio	Rango (: g mL ⁻¹)	$\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ (nm)	t_{irr}^{optimo} (min)
Diurón	HP-\$-CD, pH 5	2,3 - 11,7	317 /356	12
Linurón	\$-CD, pH 5	1,9 - 8,7	321 /356	22
Neburón	HP-\$-CD, pH 7	2,3 - 11,0	319 /359	8

III.B.2.9. - Determinación de la estequiometría y constante de formación del complejo de inclusión entre los herbicidas y las ciclodextrinas.

III.B.2.9.1.- Fundamento teórico [20]

Suponemos que la ciclodextrina, ya sea \$-CD o HP-\$-CD, forma un complejo de inclusión de estequiometría 1:1 con el fotoproducto formado según el equilibrio:



La constante de formación viene dada por la expresión

$$K_1 = \frac{[\text{FOT:CD}]}{[\text{CD}][\text{FOT}]}$$

Debido a que la concentración de CD está en exceso frente a la de herbicida, se puede aproximar

$$[\text{CD}] = [\text{CD}]_0 - [\text{FOT:CD}] \approx [\text{CD}]_0$$

Haciendo un balance de masas tenemos:

$$[\text{FOT}]_0 = [\text{FOT}] + [\text{FOT:CD}]$$

por lo que la ecuación de la constante nos queda:

$${}^aK_1 = \frac{[\text{FOT}]}{[\text{CD}]_0 * ([\text{FOT}]_0 - [\text{FOT:CD}])}$$

La intensidad de fluorescencia aumenta cuando en la disolución aumenta la concentración de CD. También hay que considerar que la fluorescencia observada es la suma de las contribuciones del fotoproducto libre y del que forma parte del complejo.

$$F = K_H [\text{FOT}] + K_C [\text{FOT:CD}]$$

donde K_H es la constante de proporcionalidad del analito libre.

Si no hay CD ! $F_0 = K_H [\text{CD}]_0$

Si $[\text{FOT}] = 0$! $F_4 = K_C [\text{FOT:CD}] = K_C [\text{FOT}]_0 = \text{constante}$

$$\frac{F - F_0}{F_\infty - F_0} = \frac{K_1[CD]_0}{1 + K_1[CD]_0}$$

reagrupando miembros se obtiene:

$$\frac{F - F_0}{[CD]_0} = (F_\infty - F_0)K_1 - (F - F_0)K_1$$

que permite calcular la estequiometría y la constante de formación.

A) MÉTODO DE BENESI -HILDEBRAND

g Determinación de la estequiometría

Para la aplicación de este método haremos uso de los datos obtenidos al estudiar la influencia de la concentración de ciclodextrina. Para comprobar si la estequiometría es 1:1 ó 1:2, analito:ciclodextrina, recurrimos a la ecuación anterior que puede ponerse en forma de gráfica de Benesi-Hildebrand.

$$\frac{1}{(F - F_0)} = \frac{1}{(F_\infty - F_0)K_1[CD]_0} = \frac{1}{(F_\infty - F_0)}$$

Una representación de $1/(F - F_0)$ frente a $1/[CD]_0$ debería darnos una línea recta en el caso de que la estequiometría fuera 1:1 y en el caso de que fuera estequiometría 1:2 obtendríamos una línea recta al representar $1/(F - F_0)$ frente a $1/[CD]_0^2$. Los valores calculados para $1/(F - F_0)$, $1/[CD]_0$ y $1/[CD]_0^2$ para los seis complejos en estudio se reúnen en tablas más adelante.

g Cálculo de la constante de formación

A partir de las representaciones anteriores, podemos calcular el valor de las constantes de formación de cada uno de los complejos. Éste se puede hallar

dividiendo la ordenada en el origen por la pendiente de la recta.

B) MÉTODO DE REGRESIÓN NO LINEAL

En general, los métodos de regresión lineal suelen poner más énfasis en los valores de concentraciones más bajas que en los valores de concentraciones más elevadas, a la hora de calcular la constante de formación del complejo. Como consecuencia de ello, la pendiente de la línea recta es más sensible al valor de la ordenada del punto que tiene la concentración más baja, puesto que pequeñas variaciones en este valor, se traducen en variaciones grandes en la pendiente de la recta. Se dice que los datos no están bien ponderados [20]. Así, para efectuar una estimación más precisa de la constante de formación, se recomienda efectuar un análisis de regresión no lineal [21].

La relación directa entre el incremento de fluorescencia observado y la concentración de ciclodextrina en molaridad (M), viene dado por la ecuación:

$$F = F_o + \frac{(F_{\infty} - F_o)K_1[CD]_o}{1 + K_1[CD]_o}$$

Utilizando esta ecuación, los datos experimentales pueden ser utilizados directamente en un programa de regresión no lineal, produciéndose una mejor estimación del valor de la constante de formación.

Para realizar el cálculo, se simplifica la ecuación anterior transformando las dos incógnitas ($F_4 - F_o$) y K_1 en dos parámetros $a(1)$ y $a(2)$, quedando la ecuación como:

$$F = F_o + \frac{a(1) * a(2) * [CD]_o}{1 + a(2) * [CD]_o}$$

III.B.2.9.2.- Influencia de la concentración de ciclodextrina

Para la aplicación de los métodos descritos en la determinación de la estequiometría y constante de los complejos formados, procedimos, en primer lugar, a estudiar la influencia de la concentración de β -CD. Las longitudes de onda de excitación y emisión y el tiempo óptimo de irradiación, para cada una de las ciclodextrinas empleadas, se resumen en la Tabla III.B.2.7.

Tabla III.B.2.7. - Condiciones de trabajo para cada uno de los herbicidas.

Herbicida (Concentración)	Ciclodextrina empleada	$\lambda_{exc} / \lambda_{em}$ (nm)	t_{irr} (min)
Diurón (4.0×10^{-4} M)	β -CD	316/358	10
	HP- β -CD	315/358	12
Linurón (4.0×10^{-4} M)	β -CD	321/356	22
	HP- β -CD	321/357	24
Neburón (1.0×10^{-4} M)	β -CD	319/358	8
	HP- β -CD	315/359	10

En la Figura III.B.2.8 se representa la señal de fluorescencia PI F frente a la concentración de ciclodextrina para los herbicidas estudiados.

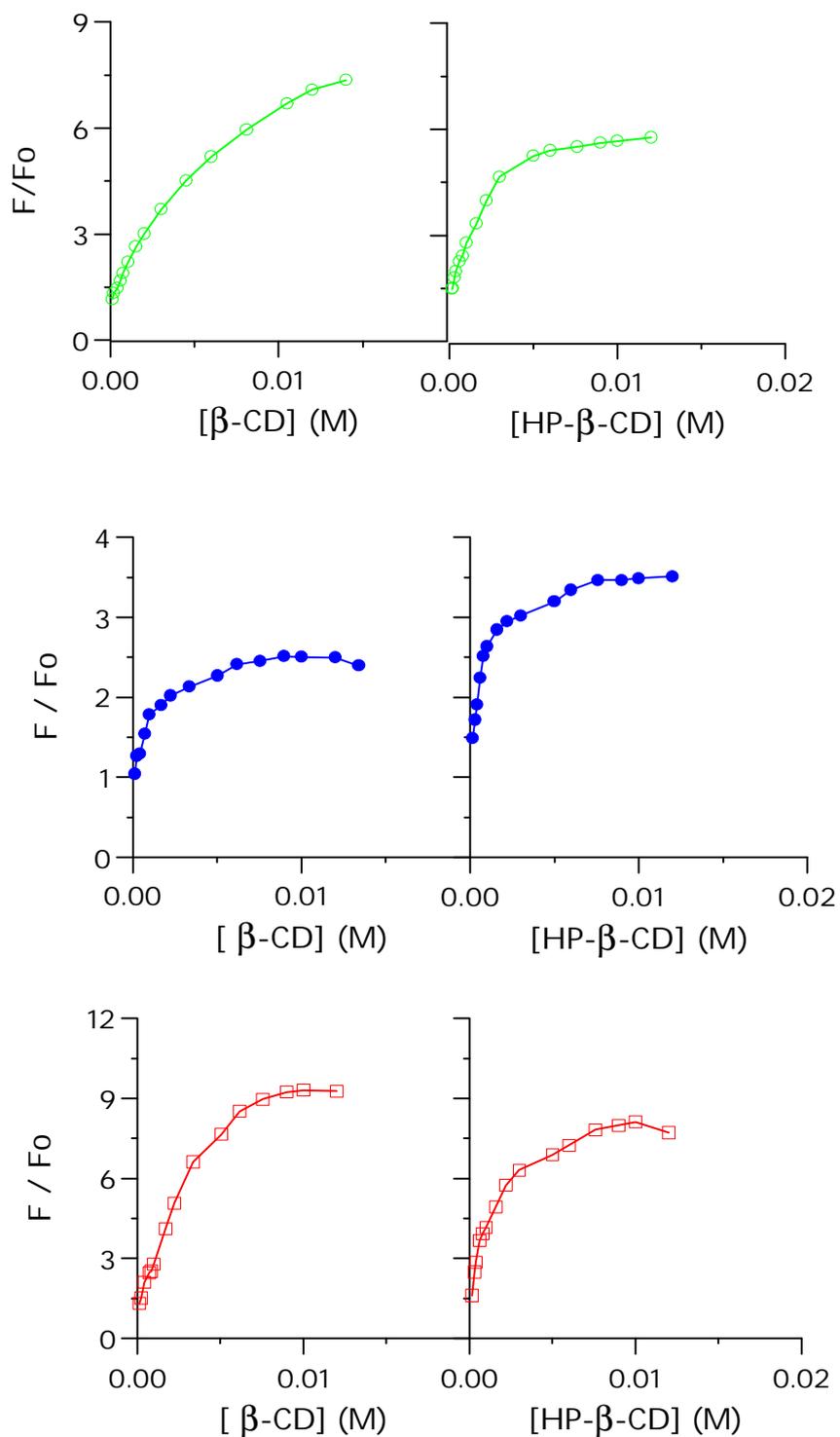


Figura III.B.2.8.- Influencia de la concentración de ciclodextrina en la señal de fluorescencia. (○) DN, (●) LN y (◻) NN.

III.B.2.9.3.- Cálculo de las estequiometrías y constantes de formación de los complejos de inclusión

A) MÉTODO DE BENESI-HILDEBRAN

Se estudia la estequiometría de los complejos formados basándonos en los datos recogidos en la Tabla III.B.2.8.

Tabla III.B.2.8.- Método de Benesi-Hildebrand para el cálculo de las estequiometrías y constantes de formación de los complejos que se forman con las ciclodextrinas.

a) **Diurón** HP-\$-CD: $F_0 = 49.38$

$1 / [\text{HP-}\$-\text{CD}] \text{ (M)}^{-1}$ 1	$1 / (F - F_0)$	$1 / [\text{HP-}\$-\text{CD}]^2 \text{ (M)}^{-2}$ 2
50000	3.943×10^{-2}	2.5×10^7
33333	2.529×10^{-2}	1.1×10^7
25000	2.080×10^{-2}	6250001
16667	1.602×10^{-2}	2777778
12500	1.419×10^{-2}	1562500
10000	1.131×10^{-2}	1000000
6250	8.684×10^{-3}	390625
4545	6.785×10^{-3}	206612
3333	5.540×10^{-3}	111111
200	4.766×10^{-3}	40000
1667	4.600×10^{-3}	27778
1316	4.492×10^{-3}	17313

$1 / [\text{HP-}\$-\text{CD}] \text{ (M)}^{-1}$ 1	$1 / (F - F_0)$	$1 / [\text{HP-}\$-\text{CD}]^2 \text{ (M)}^{-2}$ 2
1111	4.387×10^{-3}	12346

$$\$-\text{CD}: F_0 = 43.22$$

$1 / [\$-\text{CD}] \text{ (M)}^{-1}$	$1 / (F - F_0)$	$1 / [\$-\text{CD}]^2 \text{ (M)}^{-2}$
25000	4.968×10^{-2}	6250001
16667	3.367×10^{-2}	2777778
13333	2.579×10^{-2}	1777778
9524	1.913×10^{-2}	907030
6667	1.405×10^{-2}	4444444
5000	1.150×10^{-2}	250000
3333	8.556×10^{-3}	111111
2222	6.580×10^{-3}	49383
1667	5.520×10^{-3}	27778
1234	4.670×10^{-3}	15242
952	4.206×10^{-3}	9071
833	3.803×10^{-3}	6944
714	3.639×10^{-3}	5102

b) Linurón HP-\$-CD: $F_0 = 124.13$ \$-CD: $F_0 = 128.14$

$1 / [\text{HP-}\$-\text{CD}] \text{ (M)}^{-1}$	$1/ (F-F_0)$	$1 / [\text{HP-}\$-\text{CD}]^2 \text{ (M)}^{-2}$
62500	1.654×10^{-2}	3.9×10^{-7}
33333	1.122×10^{-2}	1.1×10^{-7}
25000	8.875×10^{-3}	6250001
16667	6.495×10^{-3}	2777778
12500	5.322×10^{-3}	1562500
10000	4.929×10^{-3}	1000000
6250	4.369×10^{-3}	390625
4545	4.134×10^{-3}	206612
3333	3.986×10^{-3}	111111
2000	3.665×10^{-3}	40000
1667	3.438×10^{-3}	27778
1316	3.269×10^{-3}	17313

$1 / [\$-\text{CD}] \text{ (M)}^{-1}$	$1/ F-F_0$	$1 / [\$-\text{CD}]^2 \text{ (M)}^{-2}$
14286	1.432×10^{-2}	2040817
10204	1.120×10^{-2}	1041233
5952	8.663×10^{-3}	354308
4464	7.653×10^{-3}	199299
2976	6.898×10^{-3}	88577
1984	6.148×10^{-3}	39368
1623	5.529×10^{-3}	26354
1323	5.366×10^{-3}	17497
1116	5.1581×10^{-3}	12456

c) **Neburón** HP-\$-CD: $F_0 = 28.98$ \$-CD: $F_0 = 33.27$

$1 / [\text{HP-}\$-\text{CD}] \text{ (M)}^{-1}$	$1 / (F - F_0)$	$1 / [\text{HP-}\$-\text{CD}]^2 \text{ (M)}^{-2}$
3333	2.006×10^{-2}	1111111
2500	1.615×10^{-2}	6250001
1667	1.127×10^{-2}	2777778
1250	1.026×10^{-2}	1562500
1000	9.512×10^{-3}	1000000
625	7.632×10^{-3}	390625
455	6.340×10^{-3}	206612
333	5.658×10^{-3}	111111
200	5.109×10^{-3}	40000
167	4.814×10^{-3}	27778
132	4.399×10^{-3}	17313

$1 / [\$-\text{CD}] \text{ (M)}^{-1}$	$1 / (F - F_0)$	$1 / [\$-\text{CD}]^2 \text{ (M)}^{-2}$
1191	2.273×10^{-2}	1417234
1020	1.934×10^{-2}	1041233
595	1.106×10^{-2}	354308
446	8.460×10^{-3}	199299
298	6.135×10^{-3}	88577
198	5.181×10^{-3}	39368
162	4.585×10^{-3}	26354
132	4.323×10^{-3}	17497
111	4.184×10^{-3}	12456

Asumiendo que el complejo presenta estequiometría 1:1, la representación de $1/(F-F_0)$ frente a $1/[CD]$ nos da una línea recta. La ordenada en el origen nos da $1/(F_4-F_0)$ y la constante del complejo (K_1) se puede estimar como la ordenada en el origen dividida por la pendiente.

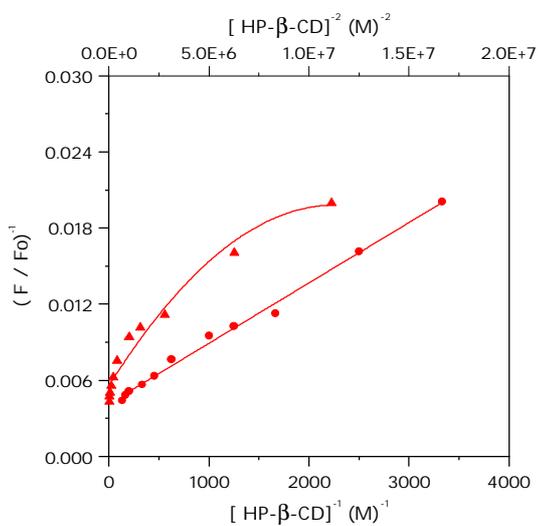
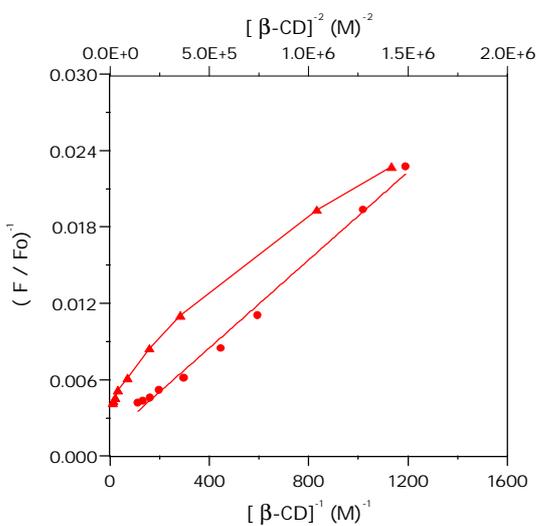
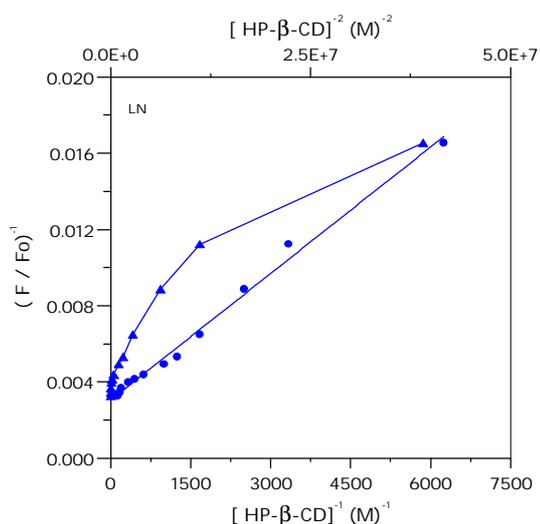
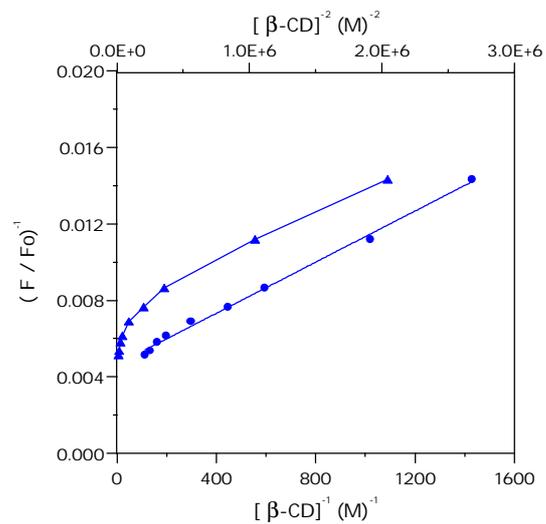
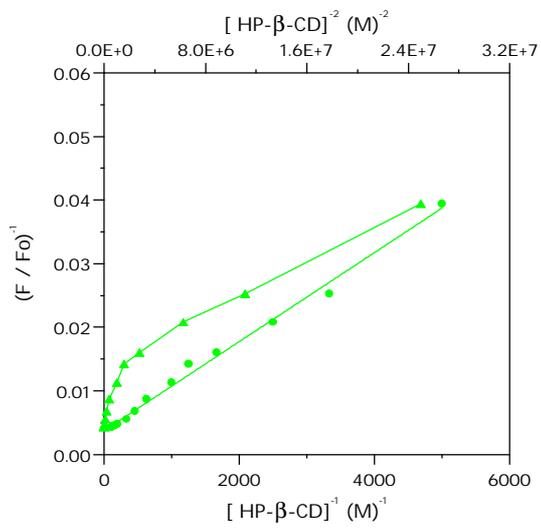
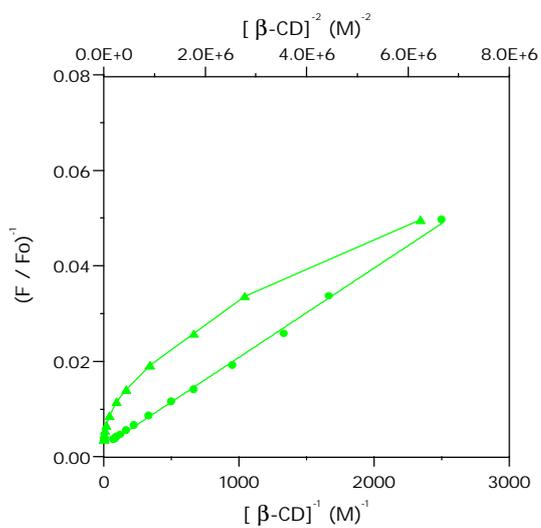
Si en vez de asumir estequiometría 1:1 suponemos estequiometría 1:2 del complejo FOT:CD, la representación de $1/(F-F_0)$ frente a $1/[CD]^2$ debería ser una línea recta, hecho que no sucede, tal y como se observa en la Figura III.B.2.9, por lo que, en todos los casos, se comprueba que la estequiometría es 1:1. En la Tabla III.B.2.9 se recogen las ecuaciones de las rectas obtenidas al suponer estequiometría 1:1.

Tabla III.B.2.9. - Ecuaciones de las rectas de los complejos formados

Compuesto	ciclodextrina	ecuación de la recta	r^2
Diurón	\$-CD	$y = 1.87 \times 10^{-5} x + 0.002$	0.998
	HP-\$-CD	$y = 7.00 \times 10^{-6} x + 0.004$	0.994
Linurón	\$-CD	$y = 6.68 \times 10^{-6} x + 0.005$	0.996
	HP-\$-CD	$y = 2.21 \times 10^{-6} x + 0.003$	0.992
Neburón	\$-CD	$y = 1.73 \times 10^{-5} x + 0.002$	0.993
	HP-\$-CD	$y = 4.76 \times 10^{-6} x + 0.004$	0.994

Figura III.B.2.9. - Método de Benesi-Hildebrand para el cálculo de estequiometrías de los complejos formados con las ciclodextrinas. DN, LN y NN.

- (•) estequiometría 1:2 analito:ciclodextrina
- (!) estequiometría 1:1 analito:ciclodextrina



B) MÉTODO DE REGRESIÓN NO LINEAL

Los parámetros iniciales que se necesitan para el cálculo de las constantes de formación de los complejos mediante este método, se toman a partir del gráfico de Benesi-Hildebrand y vienen resumidos en la Tabla III.B.2.10. La subrutina de regresión no lineal aporta una estimación de los parámetros desconocidos, $a(1)$ y $a(2)$, utilizando el proceso iterativo de Marquardt [21]. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla III.B.2.11.

Tabla III.B.2.10. - Parámetros hallados por el método de Benesi-Hildebrand.

Compuesto	\$-CD		HP-\$-CD	
	F ₀	K	F ₀	K
Diurón	43,22	114,7	49,38	536,8
Linurón	128,14	696,3	124,13	1380,0
Neburón	33,27	91,3	28,98	872,3

Tabla III.B.2.11. - Valores de las constantes de formación de los complejos formados con ciclodextrinas obtenidos mediante el método de regresión no lineal.

Complejo	K(M ⁻¹)	Log K
Diurón:HP-\$-CD	474 ± 69	2,68
Diurón:\$-CD	125 ± 12	2,10
Linurón:HP-\$-CD	1500 ± 245	3,18
Linurón:\$-CD	645 ± 154	2,81
Neburón:HP-\$-CD	736 ± 119	2,87
Neburón:\$-CD	184 ± 40	2,26

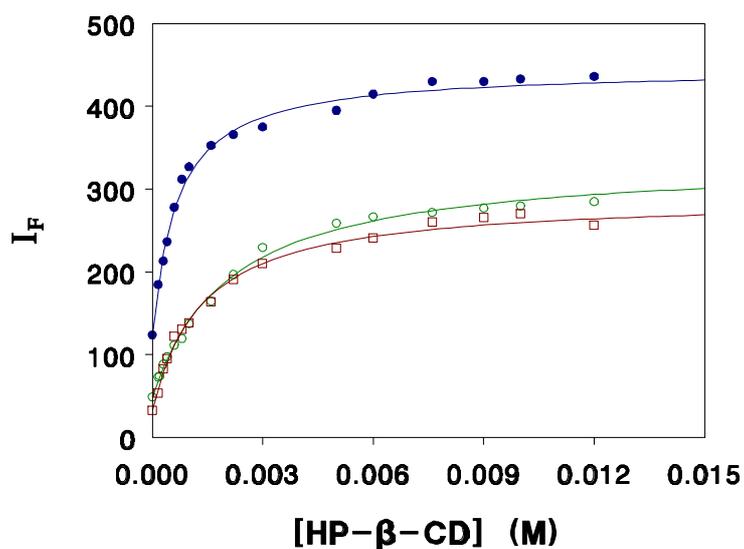
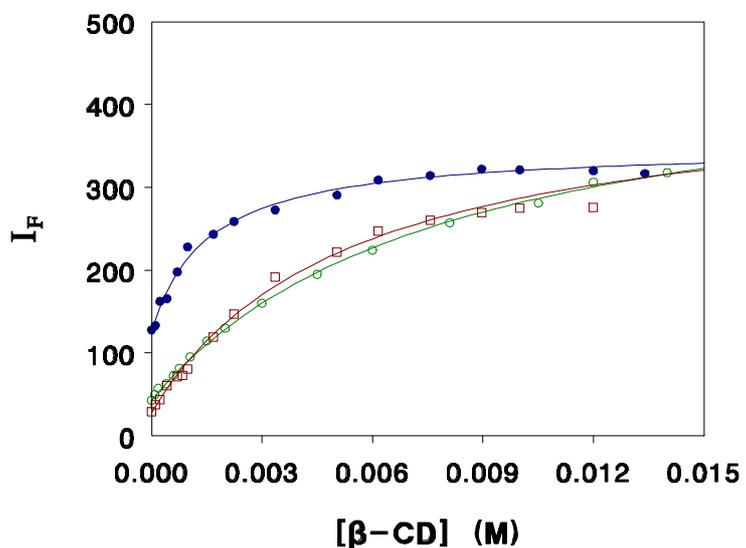


Figura III.B.2.10. - Influencia de la concentración de β -CD y HP- β -CD en la señal de fluorescencia de LN (!), DN ("") y NN (O). La línea continua ha sido calculada usando el análisis de regresión no lineal, asumiendo una estequiometría 1:1 y usando los valores de F_4 y K_1 obtenidos por el método de regresión no lineal.

Con objeto de ajustar los valores obtenidos experimentalmente a la ecuación correspondiente, en la que se hace uso de los valores de F_0 , $a(1)$ y $a(2)$, se emplea el programa Slidewin, obteniéndose las gráficas que se han mostrado en la Figura III.B.2.10 y comprobándose que hay un buen ajuste de los puntos experimentales a la ecuación.

Como puede observarse en la tabla III.B.2.11, los valores de K_1 encontrados varían entre 125 ± 12 y $1500 \pm 245 \text{ M}^{-1}$, en función de la estructura de la fenilurea estudiada y del tipo de ciclodextrina. I soproturón, como ya se señaló, no se incluyó en el estudio dado que presenta curvas de intensidad de fluorescencia versus tiempo de irradiación que no alcanzan un máximo.

Linurón, que posee una estructura de metoxiurea, presenta un valor de K_1 mucho mayor que los otros pesticidas, lo cual puede indicar que la complejación se incrementa por interacciones entre el grupo N-metoxi y los grupos -OH de las ciclodextrinas. Además, se encuentran tiempos de irradiación mayores cuando se emplea HP- β -CD que cuando es β -CD la utilizada. Por otra parte, también se obtienen mayores valores de la constante de formación cuando la ciclodextrina es HP- β -CD, lo que sugiere una mayor capacidad de complejación por parte de ésta.

Comparando las estructuras de Diurón y Neburón se puede decir que este último es un compuesto más hidrofóbico que el primero. Esto viene corroborado por los valores encontrados para el logaritmo de la constante de reparto entre n-octanol y agua, $[\log P (\text{n-octanol/agua})]$, que ambos compuestos presentan, y que son de 2.32 ± 0.45 y 3.87 ± 0.60 , respectivamente [22]. Se explica entonces que Neburón, al ser más hidrófobo, tenga más tendencia a estar dentro de la ciclodextrina, por lo que el valor de la constante va a ser mayor que el que presente Diurón, que es menos hidrófobo. Este hecho es especialmente significativo si se considera la HP- β -CD.

Un comportamiento similar ha sido encontrado en el caso de complejos de pesticidas aromáticos con ciclodextrinas [23]. Es lógico pensar que cuando mayor es

la constante, mayor cantidad de analito estará formando complejo, con lo cual estará más protegido y se necesitará mayor tiempo para producir la fotólisis. Justo lo contrario sucede cuando la constante es pequeña, que indicará que existe más analito libre, en disolución, y por tanto, el tiempo necesario para que se formen los fotoproductos fluorescentes será menor.

III.B.2.10. - Bibliografía

- [1] C. Liñan Vicente, "Farmacología Vegetal", Ediciones Agrotécnicas S.L., España (1997)
- [2] J. Trocewicz, J. Chromatogr., 725A (1996) 121
- [3] Ch. R. Worthing (Editor), "The pesticide Manual", British Crop. Protection Council, London, 9th ed., (1991)
- [4] L. Cuadros Rodríguez, A.M. García Campaña, C. Jiménez Linares, M. Román Ceba, Anal. Lett., 28 (1993) 1243
- [5] D. Azevedo, S. Lacorte, T. Vinhas, P. Viana, D. Barceló, J. Chromatogr., 879A (2000) 13
- [6] N. Henrik Spliid, B. Koppen, Chemosphere, 7 (1998), 1307
- [7] M. C. Genaro, C. Abrigo, D. Giacosa, L. Rigotti, A. Liberatori, J. Chromatogr., 718A (1995) 81
- [8] D. Barceló, M.C. Hennion, in: "Trace Determination of Pesticides and Their Degradation Products in Water", Elsevier, Amsterdam (1997)
- [9] A. Cappiello, G. Famigliani, F. Bruner, Anal. Chem., 66 (1994) 1416
- [10] A. Karn, M. Goodrow, D. Schmidt, B. Hammack, M. Bigelow, J. Agric. Food Chem., 42 (1994) 301
- [11] W.E. Pereira, F.D. Hostettler, Environ. Sci. Technol., 27 (1993) 1542
- [12] J.A. Goodrich, Jr. B. W. Lykins, R. M. Clark, J. Environ. Qual., 20 (1991) 707
- [13] S. Chiron, A.R. Fernández-Alba, A. Rodríguez, Trends in Anal. Chem., 16 (1997) 518
- [14] T.A. Albanis, D.G. Hela, T.M. Sakellirides, I.K. Konstantinou, J. Chromatogr., 823A (1998) 59
- [15] I. Ferrer, D. Barceló, J. Chromatogr., 737A (1996) 93

- [16] F. Sczesny, G. Hempel, J. Boos, G. Blanschke, *J. Chromatogr.*, 718 B (1998) 177
- [17] D. Barcelo, G. Duirand, R.J. Vreeken, G.L. de Jong, U.A. Th. Brinkman, *Anal. Chem.*, 62 (1991) 1696
- [18] C. Lacorte, C. Molina, D. Barcelo, *Anal. Chim. Acta*, 81 (1993) 71
- [19] D. Barceló, C. Porte, J. Cid, J. Albaiges, *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 38 (1990) 199
- [20] K.A. Connors, "Binding constants. The measurement of molecular complex stability", John Wiley & Sons: New York (1987)
- [21] SAS/STAT, Release 6.03; SAS Institute Inc., Cary, New York (1988)
- [22] J. Broto, *Eur. J. Med. Chem. Chim. Theor.*, 19 (1984) 71
- [23] A. Coly, J.J. Aaron, *Anal. Chim. Acta*, 360 (1998) 129

III.B.3.- ESTUDIO ESPECTROFLUORIMÉTRICO DE LAS FENILUREAS EN MEDIOS MICELARES

III.B.3.1.- Comparación de las señales en medio acuoso y en 2-propanol

III.B.3.2.- Efecto del pH

III.B.3.3.- Influencia del tiempo de irradiación

III.B.3.4.- Efecto del tiempo de irradiación en la señal del disolvente

III.B.3.5.- Efecto de la concentración de SDS y CTAC

III.B.3.6.- Estabilidad del fotoproducto

III.B.3.7.- Rectas de calibrado

III.B.3.7.1.- Ecuación de la recta y parámetros estadísticos

III.B.3.7.2.- Parámetros de fiabilidad. Repetitividad

III.B.3.8.- Aplicación del método propuesto a la determinación de fenilureas en agua

III.B.3.9.- Método operatorio

III.B.3.10.- Bibliografía

g Este Estudio fue presentado como Comunicación en el Congreso:
"6th international conference on methods and applications of fluorescence spectroscopy", Paris, Francia (1999). Título: "Photochemically-induced fluorescence spectrometry in micellar media for determining phenylurea herbicides". Autores: A. Bautista-Sánchez, J. J. Aaron, M. C. Mahedero, A. Muñoz de la Peña, F. Salinas. Comunicación: P-138.

g También ha dado lugar al artículo: "Usefulness of micellar media for the quantitative analysis of phenylurea herbicides in water by photochemically-induced fluorescence". A. Bautista, J.J. Aaron, M. C. Mahedero, A. Muñoz de la Peña, *Analisis* 27 (1999) 857 - 863.

A pesar de su gran interés analítico, los medios micelares han sido raramente aplicados al análisis de pesticidas mediante fluorimetría o fluorescencia inducida fotoquímicamente (PIF) [1-3]. Recientemente, se ha propuesto el uso de disoluciones acuosas micelares para mejorar la detección de fenvalerato y deltametrin [2], así como de algunos herbicidas de la familia de las sulfonilureas [3].

En este Subcapítulo, como continuación de nuestros estudios de herbicidas de la familia de las fenilureas, en varios disolventes [4], examinaremos la utilidad de medios acuosos micelares para el análisis de estos compuestos mediante fluorescencia inducida fotoquímicamente, así como las posibles ventajas de estos medios con respecto al análisis en disolución acuosa.

Describimos un método para la determinación de cuatro herbicidas de la familia de las fenilureas: Diurón, Linurón, Isoproturón y Neburón, basado en su reacción fotolítica en medios micelares aniónicos y catiónicos. El método se aplica al análisis cuantitativo de estos herbicidas en muestras de agua naturales.

III.B.3.1. - Comparación de las señales en medio acuoso y en 2-propanol

El trabajo antes realizado con estos herbicidas [4], puso de manifiesto que los mejores resultados, para la obtención de fluorescencia fotoinducida, se producían en 2-PrOH. No obstante, los estudios se realizaron en mezclas 2-PrOH:H₂O a fin de disponer de un margen acuoso para la aplicación del método a muestras reales.

No se trabajó con mayores contenidos de agua porque se comprobó que, por una parte, aumentaba el tiempo de irradiación y por otra, la intensidad de

fluorescencia inducida fotoquímicamente de algunos fotoproductos disminuía.

Sin embargo, para el análisis de residuos de pesticidas en agua, se recomienda el uso de un medio acuoso. Se han observado incrementos significativos en la señal de fluorescencia para insecticidas piretroides [2] y para herbicidas de la familia de las sulfonilureas [3], cuando se usan medios micelares. Teniendo en cuenta estas consideraciones, decidimos estudiar el efecto de estos medios micelares en las propiedades de fluorescencia inducida de los herbicidas seleccionados.

USO DE MEDIOS ORGANIZADOS

Los medios micelares tienen la habilidad de solubilizar, mediante la formación de agregados en disolución, una gran variedad de fluoróforos hidrofóbicos, dando lugar a un aumento en la intensidad de fluorescencia. En nuestro caso, vamos a trabajar con dos surfactantes, uno aniónico, dodecil sulfato sódico (SDS) y otro catiónico, cloruro de cetiltrimetilamonio (CTAC), cuyas estructuras son las que se muestran en la Figura III.B.3.1.

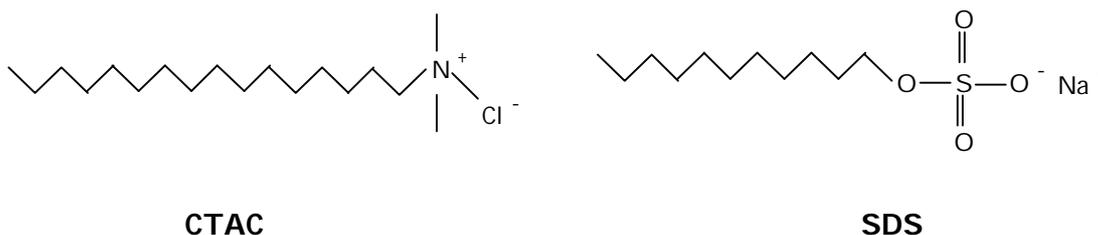


Figura III.B.3.1.- Estructuras de los medios micelares empleados

III.B.3.2.- Efecto del pH

Para llevar a cabo esta experiencia se trabaja con una concentración final del herbicida Linurón de 5.0×10^{-6} M ; de SDS 6.0×10^{-2} M y con un 20 % de disoluciones tampón de pH 2, 5, 7 y 9. En todas ellas se estudiará la evolución de la señal fluorescente con el tiempo de irradiación.

Los resultados obtenidos, muestran que los medios fuertemente ácidos o básicos influyen negativamente en la obtención de señales fluorescentes. En experiencias posteriores, se trabajará con tampones de pH 5 y 7, por ser los más próximos al pH de las disoluciones iniciales de todos los herbicidas en estudio, comprendidos entre 6 y 7.

Respecto a Linurón, se observa que presenta dos pares de longitudes de onda de excitación y de emisión a los que serán realizadas las medidas: $\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 282/316$ nm y $\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 324/418$ nm.

III.B.3.3.- Influencia del tiempo de irradiación

Se estudia la evolución de la señal de intensidad PIF con el tiempo de irradiación, con objeto de evaluar la cinética de formación del fluoróforo. Se trabaja con concentraciones finales de CTAC y SDS de 5.0×10^{-3} y 5.0×10^{-2} M, respectivamente y de herbicidas 5.0×10^{-5} M, excepto para LN que es de 5.0×10^{-6} M.

Salvo Linurón, los otros herbicidas sólo originan un fotoproducto fluorescente tras la irradiación UV, en medios SDS y CTAC,

Linurón se fotodescompone en 2 fotoproductos fluorescentes que emiten a 314 nm ($\lambda_{exc} = 282$ nm) y 418 nm ($\lambda_{exc} = 324$ nm), esta última banda será la empleada en experiencias posteriores, dado que proporciona mayor señal, tal y como se muestra en la Figura III.B.3.2.

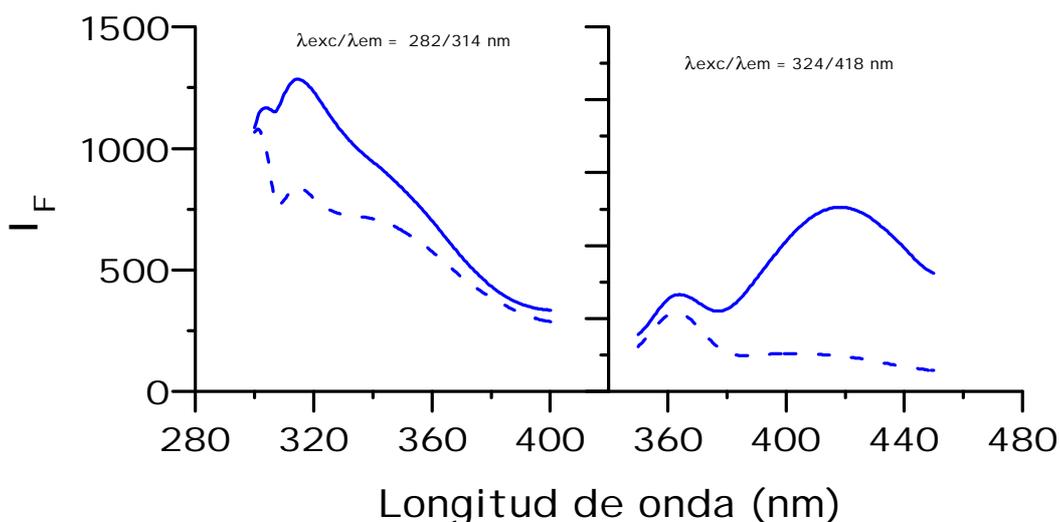


Figura III.B.3.2.- Señal PIF presentada por LN empleando una concentración de CTAC de 5.0×10^{-3} M (—). Señal del blanco (- -).

En las Figuras III.B.3.3-4, se muestran los resultados obtenidos con cada uno de los herbicidas a distintos pH y en cada uno de los disolventes. Como se puede comprobar, el efecto de la radiación UV sobre la señal de fluorescencia depende del compuesto, del pH y del medio micelar empleado.

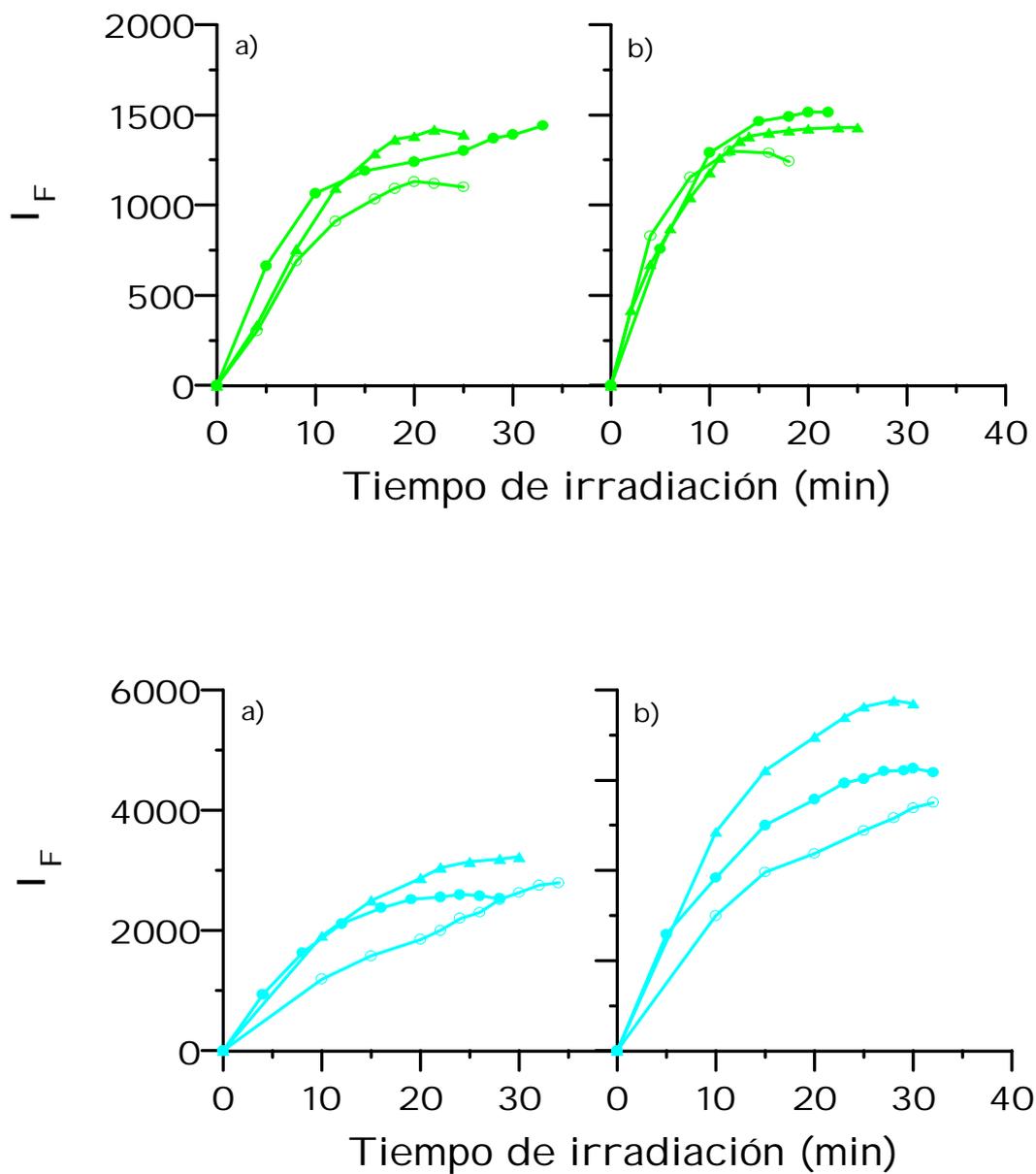


Figura III.B.3.3.- Influencia del tiempo de irradiación en la señal PIF de

DN e IN, a) SDS y b) CTAC.

(!) Sin adición de tampón

(") Tampón de pH = 5

(•) Tampón de pH = 7

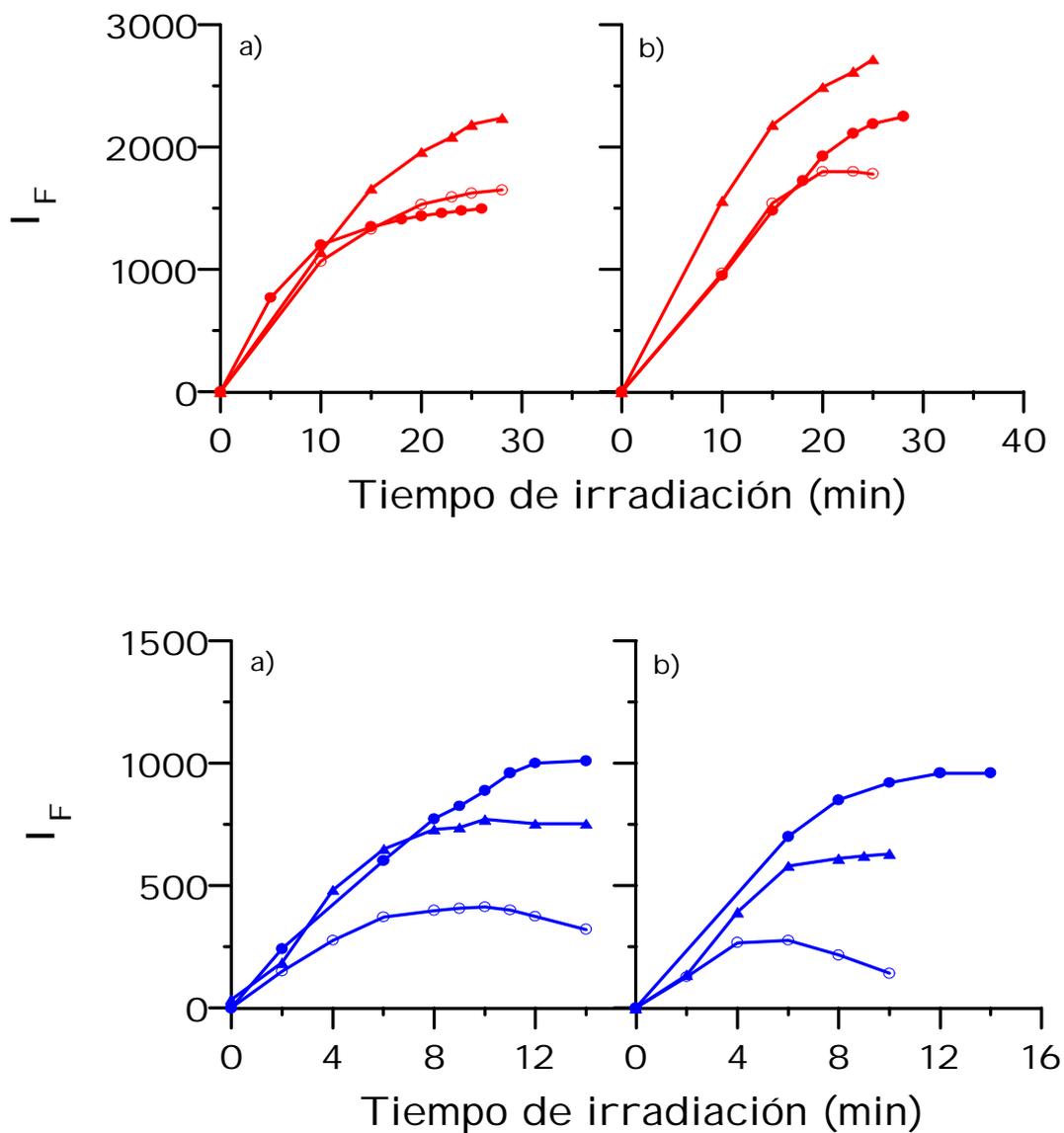


Figura III.B.3.4.- Influencia del tiempo de irradiación en la señal PIF de

LN y NN, a) SDS y b) CTAC.

(!) Sin adición de tampón

(") Tampón de pH = 5

(•) Tampón de pH = 7

El comportamiento de DN con el pH, depende del tipo de micela: así en SDS, la mayor señal PIF se midió a pH 7, mientras que en CTAC, la intensidad PIF fue algo mayor en la disolución sin tamponar.

La intensidad de fluorescencia fotoinducida decrece en las disoluciones tamponadas en ambos medios micelares, SDS y CTAC, respecto a las señales relativas a las disoluciones micelares sin tamponar, para el caso de LN. Respecto a IN y NN, las mayores señales PIF se obtuvieron en disoluciones tamponadas a pH 7, en ambos medios.

Dado que las mayores señales analíticas se registraron en medio tamponado a pH 7, para la mayor parte de los pesticidas, este medio se seleccionó como solución de compromiso para los estudios analíticos posteriores. De hecho, si asumimos que una de las especies prototrópicas del fotoproducto es más fluorescente que la otra, la señal que se obtenga, al pH elegido, dependerá del porcentaje de esta especie en el medio micelar, en relación con el pKa del fotoproducto.

En la mayoría de los casos la señal de fluorescencia aumenta inicialmente con el tiempo, alcanzando un valor máximo y decreciendo después. Como ejemplo de este comportamiento, tenemos los correspondientes a DN (en medio CTAC, pH 5), LN (en medio SDS, a los dos pH) e IN (en medio CTAC, pH 7). Sin embargo, también se dan casos en los que la cinética de la fotólisis se caracteriza por un aumento continuo de la señal PIF, a medida que transcurre el tiempo, sin llegarse a alcanzar un máximo bien definido, como sucede con NN (en medio SDS y CTAC, pH 7).

Estos dos tipos de curvas cinéticas pueden ser explicadas considerando la existencia de dos tipos de mecanismos de fotólisis de los herbicidas en estudio.

g El primer tipo correspondería a un mecanismo en dos pasos: formación de las especies fluorescentes y subsiguiente fotodegradación de estos compuestos en especies no fluorescentes.

g El segundo tipo de curvas indicaría la formación de productos fluorescentes de forma progresiva.

Estas cinéticas fueron similares a las ya encontradas cuando se emplearon insecticidas aromáticos [2] y sulfonilureas [3]. A continuación, en la Tabla III.B.3.1, se presentan las señales PI F de cada uno de los herbicidas en los diferentes medios ensayados, así como las longitudes de onda de excitación y emisión y los tiempos óptimos de irradiación. En **negrita** se resaltan las condiciones elegidas como óptimas para establecer las correspondientes rectas de calibrado.

En la mayoría de los casos, los medios micelares producen incrementos significativos de las intensidades PI F respecto a las intensidades que se obtienen en agua, aunque los tiempos de irradiación son mayores. Los factores de incremento micelar (F.I.M.), definidos como la relación entre la intensidad PI F en medio micelar y en agua, varían entre 0.8 y 16.9, dependiendo del compuesto, naturaleza del surfactante y pH. CTAC produce mayor incremento de la señal que SDS, para todos los herbicidas ensayados. Los mayores incrementos se encontraron en CTAC para LN a pH 7 y LN, mientras que DN y NN dieron valores de F.I.M. que eran algo mayores que la unidad, en CTAC, y próximos a uno en SDS.

Como se puede observar, si se compara con el agua pura, todos los compuestos presentan un desplazamiento del máximo de emisión, de entre 58-84 nm, en medio micelar, lo que indica la existencia de interacciones significativas entre los fotoproductos de los herbicidas y las micelas.

Tabla III.B.3.1. - Propiedades PIF de los herbicidas en estudio, en varios disolventes.

Compuesto	Medio ^a	$\delta_{exc} / \delta_{em}$ (nm)	t_{irr}^{opt} (min) ^b	I_F^c	F.I.M. ^d
LN (5×10^{-6} M)	2-propanol	324 / 406	4	8.5	-
	H ₂ O	324 / 360	3	1.0	-
	SDS	324 / 418	10	6.1	6.1
	SDS (pH=5)	324 / 418	10	2.9	2.9
	SDS (pH=7)	320 / 414	8	5.0	5.0
	CTAC	324 / 418	10	6.3	6.3
	CTAC (pH=5)	324 / 418	4	1.8	1.8
	CTAC (pH=7)	324 / 418	8	4.1	4.1
DN (5×10^{-5} M)	2-propanol	312 / 424	8	4.0	-
	H ₂ O	312 / 350	3	1.1	-
	SDS	318 / 430	25	1.1	1.0
	SDS (pH=5)	318 / 430	20	1.0	0.9
	SDS (pH=7)	318 / 430	22	1.3	1.2
	CTAC	314 / 434	18	1.3	1.2
	CTAC (pH=5)	318 / 430	12	1.1	1.0
	CTAC (pH=7)	324 / 430	16	1.2	1.1
IN (5×10^{-5} M)	2-propanol	312 / 436	6	42.0	-
	H ₂ O	330 / 370	8	1.0	-
	SDS	300 / 436	24	8.3	8.3
	SDS (pH=5)	300 / 436	30	7.6	7.6
	SDS (pH=7)	300 / 436	25	9.3	9.3
	CTAC	306 / 436	25	14.6	14.6
	CTAC (pH=5)	306 / 436	30	11.9	11.9
	CTAC (pH=7)	306 / 436	25	16.9	16.9
NN (5×10^{-5} M)	2-propanol	312 / 422	12	1.7	-
	H ₂ O	306 / 350	4	1.2	-
	SDS	308 / 432	20	1.0	0.8
	SDS (pH=5)	308 / 432	20	1.1	0.9
	SDS (pH=7)	308 / 432	20	1.4	1.1
	CTAC	308 / 432	20	1.5	1.2
	CTAC (pH=5)	308 / 434	20	1.2	1.0
	CTAC (pH=7)	308 / 434	20	1.7	1.4

^a [CTAC] = 8×10^{-3} M; [SDS] = 8×10^{-2} M.

^b Tiempo de irradiación óptimo, correspondiente a la máxima señal PIF (I_F).

^c Máxima señal relativa PIF, corregida y normalizada con la menor señal para cada compuesto.

^d F.I.M.: factor de incremento micelar.

III.B.3.4.- Efecto del tiempo de irradiación en la señal del disolvente

Se estudió de qué manera afecta el tiempo de irradiación al medio micelar, exento de analito. Los resultados, representados en la Figura III.B.3.5, ponen de manifiesto que cuando se trabaja a las longitudes de onda de LN, un aumento en el tiempo de irradiación supone una disminución en la señal debida a SDS. Se trabaja con una concentración de 0.1 M, observándose que la señal más intensa se obtiene a la menor longitud de onda de excitación. En el caso del CTAC el comportamiento es similar.

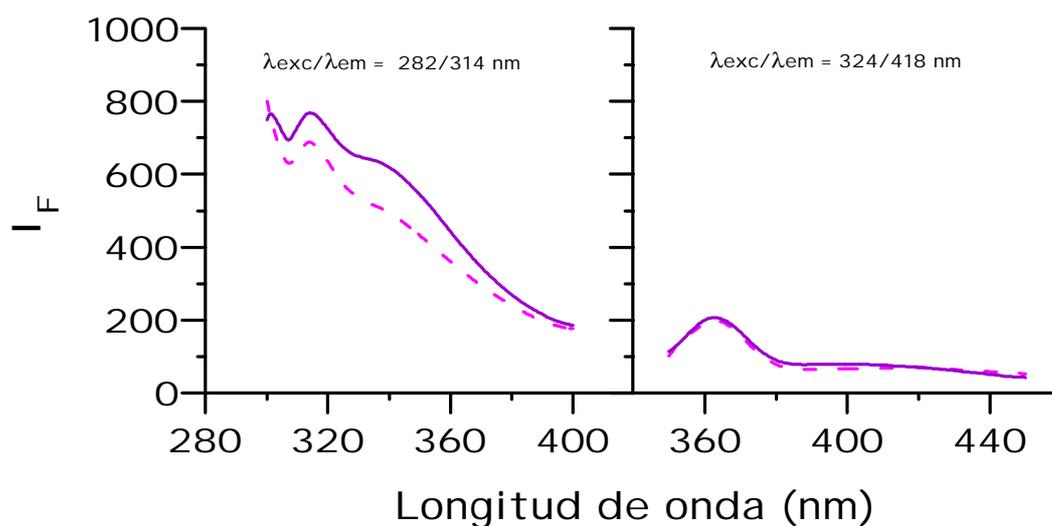


Figura III.B.3.5.- Influencia del tiempo de irradiación en la señal de SDS, medidos a las longitudes de onda de LN, (—) $t_{irr} = 0$ minutos, (- -) $t_{irr} = 5$ minutos.

Las experiencias realizadas con las longitudes de onda de los otros herbicidas, muestran que la señal del disolvente disminuye ligeramente cuando aumenta el tiempo de irradiación.

Dado que, en el caso de LN, empleando como $\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 282/314$ nm, la señal del disolvente es elevada, incluso después de la irradiación, se decide eliminar esta pareja de longitudes de onda, para posteriores experiencias.

A todas las medidas realizadas se le ha restado la señal del blanco, irradiado el mismo tiempo que la correspondiente disolución.

III.B.3.5.- Efecto de la concentración de SDS y CTAC

Para determinar la concentración óptima de surfactante, se diseñó una experiencia en la que se mantuvo una concentración de LN 6.0×10^{-6} M y se añadieron volúmenes crecientes de una disolución madre de SDS 5.0×10^{-2} M o CTAC, 5.0×10^{-3} M, respectivamente, ambas superiores a la c.m.c., que como ya hemos dicho antes es de 1.3×10^{-3} M, en el caso de CTAC y 8.6×10^{-3} M, en el de SDS.

La longitud de onda de excitación y emisión es de 324 nm y 418 nm, respectivamente, correspondientes a las longitudes de onda de LN, y el tiempo de irradiación es de 10 minutos.

Tal y como se observa en la Figura III.B.3.6, en ambos medios, se pone de manifiesto que un aumento en la concentración de surfactante supone un aumento en la señal de fluorescencia inducida fotoquímicamente.

El incremento de la intensidad PIF ocurre a concentraciones de surfactante cercanas a la c.m.c. Éste puede ser atribuido a la disminución de los movimientos vibracionales e incremento de la rigidez de las moléculas de los fotoproductos cuando se incluyen en la micela.

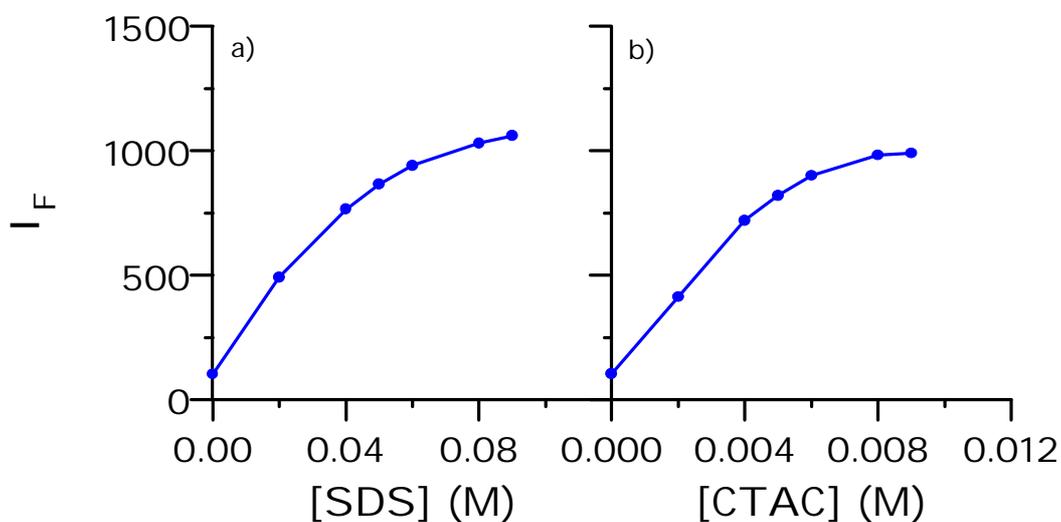


Figura III.B.3.6.- Influencia de la concentración de surfactante en la señal de fluorescencia. a) SDS, b) CTAC.

Se decide emplear una concentración de CTAC 8.0×10^{-3} M y de SDS 8.0×10^{-2} M, para las sucesivas experiencias. No es posible adicionar la máxima cantidad posible de medio micelar puesto que se debe dejar un determinado volumen para la adición del tampón correspondiente.

III.B.3.6.- Estabilidad del fotoproducto

Para comprobar durante cuanto tiempo son estables los fotoproductos que se forman una vez irradiada la disolución del herbicida, al tiempo fijado para cada herbicida, se llevan a cabo las experiencias en las condiciones óptimas de trabajo.

En la Figura III.B.3.7, se muestra dicha estabilidad para todos los herbicidas, en SDS y CTAC, a pH 7.

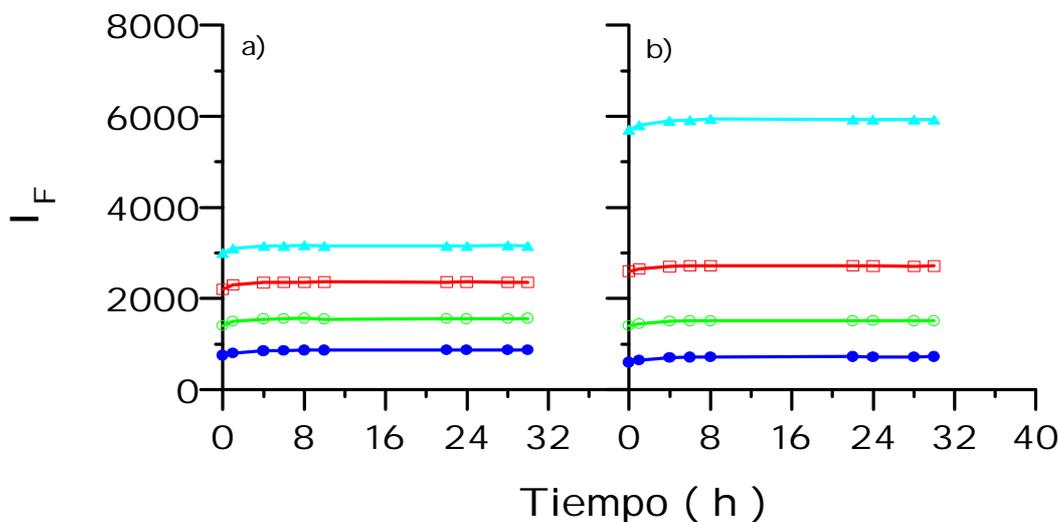


Figura III.B.3.7.- Estabilidad del fotoproducto formado a lo largo del tiempo. DN (▲), IN (◻), LN (○) y NN (●).

a) en SDS, b) CTAC

Se aprecia un ligero aumento de la señal PIF durante las primeras horas, manteniéndose prácticamente constante durante un mínimo de 30 horas, después de la irradiación, y siempre que las disoluciones micelares se mantengan en la oscuridad.

III.B.3.7.- Rectas de calibrado

Con objeto de evaluar la utilidad analítica del método puesto a punto, se establecen las correspondientes rectas de calibrado en las condiciones fijadas como óptimas, Tabla III.B.2, para cada uno de los herbicidas y con los parámetros instrumentales fijados en el espectrofluorímetro Perkin Elmer LS 5:

○ Sensibilidad = 1

○ Rendijas = 10nm

○ T^a de trabajo = 20 °C

○ tiempo de respuesta = 4

Tabla III.B.3.2. - Condiciones óptimas.

Compuesto	Medio	pH	$\lambda_{exc} / \lambda_{em}$ (nm)	$t_{irr.}^{opt}$ (min)
Linurón	SDS ^a	7	320 / 414	8
Diurón	SDS	7	318 / 430	22
I soproturón	CTAC ^b	7	306 / 436	25
Neburón	CTAC	7	308 / 434	20

^a [SDS] = 8.0×10^{-2} M

^b [CTAC] = 8.0×10^{-3} M

III.B.3.7.1.- Ecuación de la recta de calibrado y parámetros estadísticos

En la Tabla III.B.3.3 se recogen las ecuaciones y los valores de los parámetros estadísticos calculados a partir de las rectas de calibrado, empleando el programa Alamin [4] y en la Figura III.B.3.8, se representan las rectas de calibrado de cada compuesto.

Tabla III.B.3.3.- Parámetros estadísticos obtenidos en la calibración univariante de **Diurón** e **Isoproturón**.

	Diurón	Isoproturón
Ordenada en el origen: a	84,9	132,5
Desviación estándar de a: s_a	13,8	45,7
Desviación estándar relativa de a: $DER(a)$ (%)	16,2	34,5
Pendiente: b	145,3	721,2
Desviación estándar de b: s_b	3,8	12,9
Desviación estándar relativa de b: $DER(b)$ (%)	2,6	1,8
Desviación estándar de regresión: $s_{y,x}$	39,7	133,5
Coefficiente de correlación: r	0,995	0,997
Coefficiente de determinación: r^2	0,990	0,994

Tabla III.B.3.4.- Parámetros estadísticos obtenidos en la calibración univariante de **Linurón** y **Neburón**.

	Linurón	Neburón
Ordenada en el origen: a	157,7	6,4
Desviación estándar de a: s_a	26,7	17,0
Desviación estándar relativa de a: $DER(a)$ (%)	16,9	267,3
Pendiente: b	423,2	240,4
Desviación estándar de b: s_b	7,7	5,5
Desviación estándar relativa de b: $DER(b)$ (%)	7,8	2,3
Desviación estándar de regresión: $s_{y,x}$	73,5	451,8
Coefficiente de correlación: r	0,997	0,996
Coefficiente de determinación: r^2	0,994	0,988

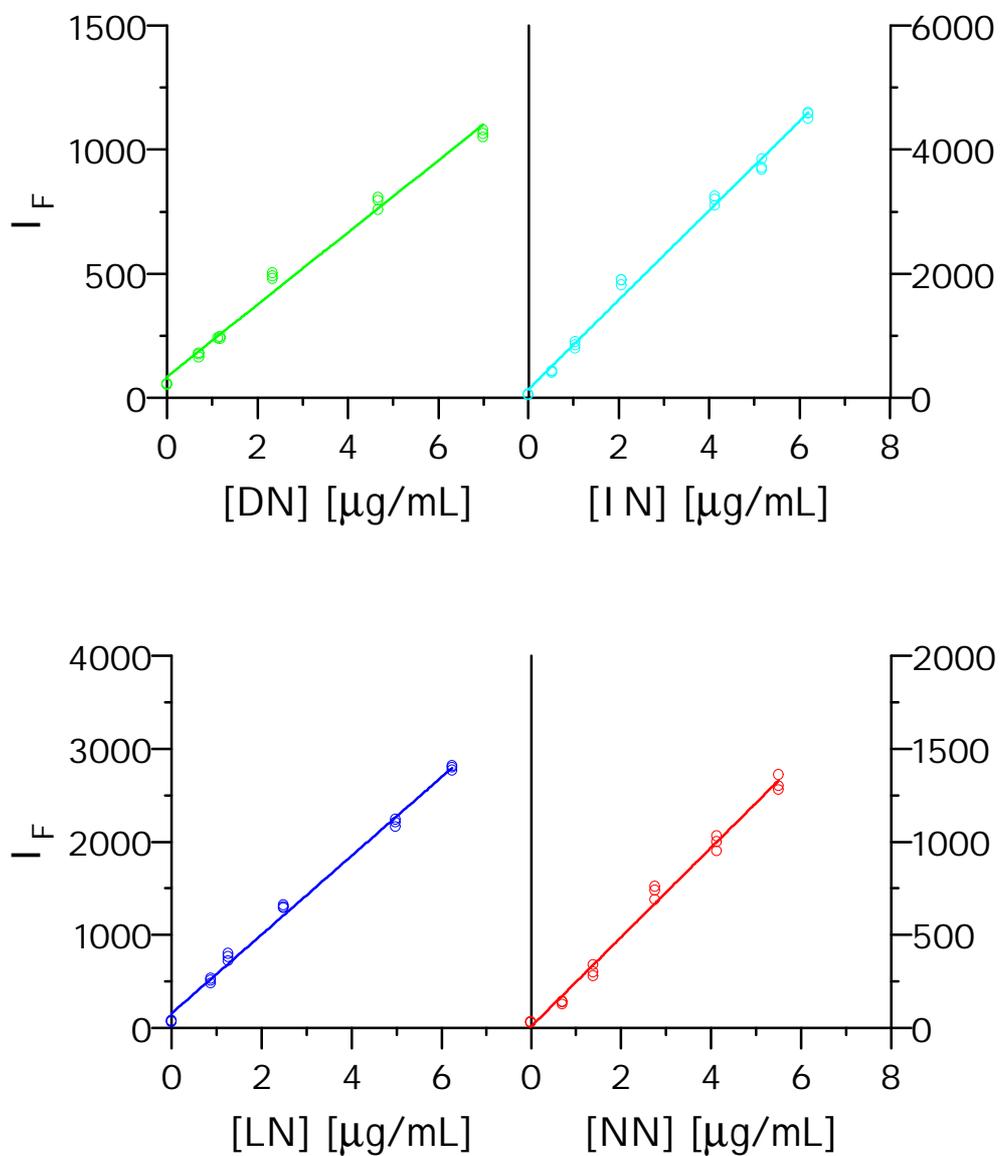


Figura III.B.3.8. - Rectas de calibrado.

III.B.3.7.2. - Parámetros de fiabilidad. Repetitividad

La estimación de los parámetros analíticos se reúnen en las Tablas III.B.3.5-6 y en la Figura III.B.3.9 se representan gráficamente los valores de precisión para cada uno de los valores de concentración del calibrado.

Tabla III.B.3.5. - Parámetros de fiabilidad aplicando el modelo de regresión lineal para Diurón e Isoproturón.

	Diurón	Isoproturón
Linealidad (1- $DER(b)$) %	97,4	98,2
Sensibilidad analítica (: g mL^{-1})	0,27	0,18
Desviación estándar del blanco	0,19	0,12
Límite de determinación (IUPAC)	1,86	1,25
LD, Clayton (: g mL^{-1})	0,64	0,43
LD, Winefordner y Long (: g mL^{-1})	0,29	0,19

Tabla III.B.3.6. - Parámetros de fiabilidad aplicando el modelo de regresión lineal para Linurón y Neburón.

	Linurón	Neburón
Linealidad (1- $DER(b)$) %	98,2	97,7
Sensibilidad analítica (: g mL^{-1})	0,17	0,19
Desviación estándar del blanco	0,12	0,13
Límite de determinación (: g mL^{-1})	1,20	1,29
LD, Clayton (: g mL^{-1})	0,41	0,44
LD, Winefordner y Long (: g mL^{-1})	0,19	0,21

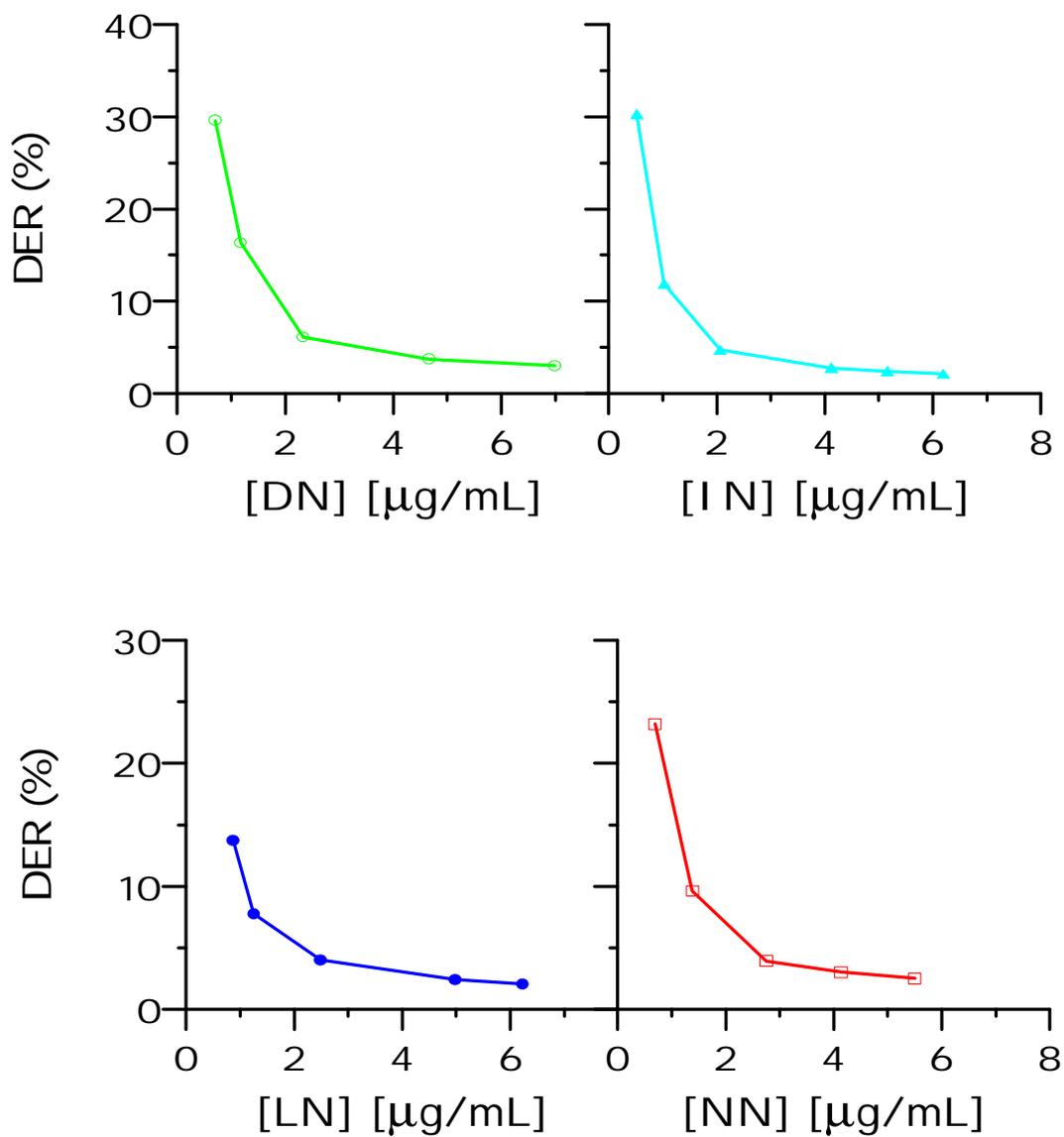


Figura III.B.3.9. -Variación de la precisión del método analítico en función de la concentración de los herbicidas.

III.B.3.8.- Aplicación del método propuesto a la determinación de fenilureas en agua

Con objeto de comprobar la aplicabilidad analítica del método propuesto en muestras reales, se llevaron a cabo experimentos de recuperaciones de los herbicidas en estudio en muestras de agua del río Sena (París) y en agua potable.

En el agua del grifo no se encontró la presencia de especies fluorescentes disueltas, y se midió el pH resultando ser de 8.0. En cambio, el agua del Sena se filtró con papel de filtro Whatman N°1, con objeto de eliminar la materia orgánica suspendida. No se encontraron residuos de ninguno de los herbicidas en estudio pero sí la presencia de especies fluorescentes con longitudes de onda de $\lambda_{exc} = 332$ nm y $\lambda_{em} = 422$ nm, relativamente cerca de los máximos de excitación y emisión presentados por los herbicidas. El pH medido fue de 8.2.

Las muestras de aguas fueron fortificadas con 19.93, 34.96, 20.63 y 13.76 : g mL⁻¹ de LN, DN, I N y NN, respectivamente. Las disoluciones fueron agitadas en el ultrasonido durante 5 minutos, siendo después almacenadas en la oscuridad y empleadas como disoluciones madre. Se tomaron tres alícuotas (0.4, 0.6 y 0.8 mL), de cada una de las disoluciones madre, y se introdujeron en matraces de 5.00 mL, a los que previamente se les había adicionado el volumen conveniente de solución micelar, 1.0 mL de tampón de pH 7 y agua ultrapura hasta enrase. A continuación, fueron irradiadas y se tomaron las medidas correspondientes. Para los experimentos de recuperación se utilizó el procedimiento de la adición patrón o estándar.

Método de la adición patrón o de estándar

Al utilizar la adición patrón como técnica para comprobar la validez de un método analítico, es necesario asegurar que no existe efecto matriz-analito, es decir, que no existe un error sistemático proporcional que provocaría una modificación de la pendiente de la recta de calibrado con adición. Por ello, debe compararse la pendiente de la recta de calibrado con la pendiente obtenida en el calibrado con adición patrón. Si estas rectas son paralelas implica la ausencia del efecto matriz-analito, antes mencionado.

La adición patrón debe dar lugar a un error sistemático constante con objeto de poder emplearla para comprobar la veracidad del método analítico. Si existiera un error proporcional, invalidaría dicha comprobación. Para comparar las pendientes, se utiliza un test de la t de Student, con $(n_S + n_A - 4)$ grados de libertad. La expresión que se emplea es la siguiente:

$$t_{\text{cal}}(b) = \frac{|b_S - b_A|}{S_p^2 \sqrt{\frac{1}{\sum (c_{i,S} - \bar{c}_S)^2} + \frac{1}{\sum (c_{i,A} - \bar{c}_A)^2}}}$$

b_S : pendiente de la recta de calibrado

b_A : pendiente de la recta de la adición patrón.

S_p : desviación estándar promedio entre el calibrado y la recta de adición patrón.

$c_{i,S}$: valores de cada concentración usados en el calibrado con patrones tomados de forma individual.

$c_{i,A}$: valores de cada concentración usados en la adición patrón tomados de forma individual.

\bar{C}_S : es la concentración media del conjunto de patrones añadidos en la recta de adición patrón.

\bar{C}_A : concentración media del conjunto de patrones añadidos en la recta de adición patrón.

La desviación estándar promedio se calcula:

$$S_p = \sqrt{\frac{(n_S - 2)s_S^2 + (n_A - 2)s_A^2}{n_S + n_A - 4}}$$

Las abreviaturas corresponden a:

n_S : número de datos utilizado para establecer el calibrado con patrones.

n_A : número de datos utilizado para establecer la recta de adición patrón.

s_S : desviación estándar de regresión de la recta de calibrado.

s_A : desviación estándar de regresión de la recta de adición patrón.

Las pendientes no difieren significativamente para un nivel de significación de 0.05 si el valor de $t(b)$ calculada, t_{cal} , es menor que $t(b)$ tabulada, t_{tab} .

Para llevar a cabo el método de la adición patrón, en matraces de 5.00 mL, se adicionaron distintas cantidades de la disolución madre de cada herbicida para dar una concentración final en el matraz de 2.80, 1.65, 1.59 y 1.10 : g mL⁻¹ de DN, I N, LN y NN, respectivamente, y a continuación, se añadieron volúmenes crecientes de cada herbicida, de forma que la concentración variara dentro del rango establecido para cada uno de ellos. Se adicionó 1.00 mL de tampón de pH 7, disolución micelar para que la concentración final fuese de 8.0x10⁻², en el caso de SDS, o bien, 8.0x10⁻³, en el caso de CTAC. Por último se enrasa con agua ultrapura.

Tras la correspondiente irradiación, se midieron las señales de fluorescencia, obteniéndose así las rectas de adición patrón que se muestra en la Figura III.B.3.10. Para comprobar que las pendientes de las rectas de calibrado y de adición patrón no son significativamente diferentes, se llevó a cabo el estudio de validación propuesto por Cuadros Rodríguez y col. [5,6], según los cuales, la t estadística de las pendientes debe ser menor que la t de Student tabulada para un α de 0.05 y $(n_S + n_A - 4)$ grados de libertad.

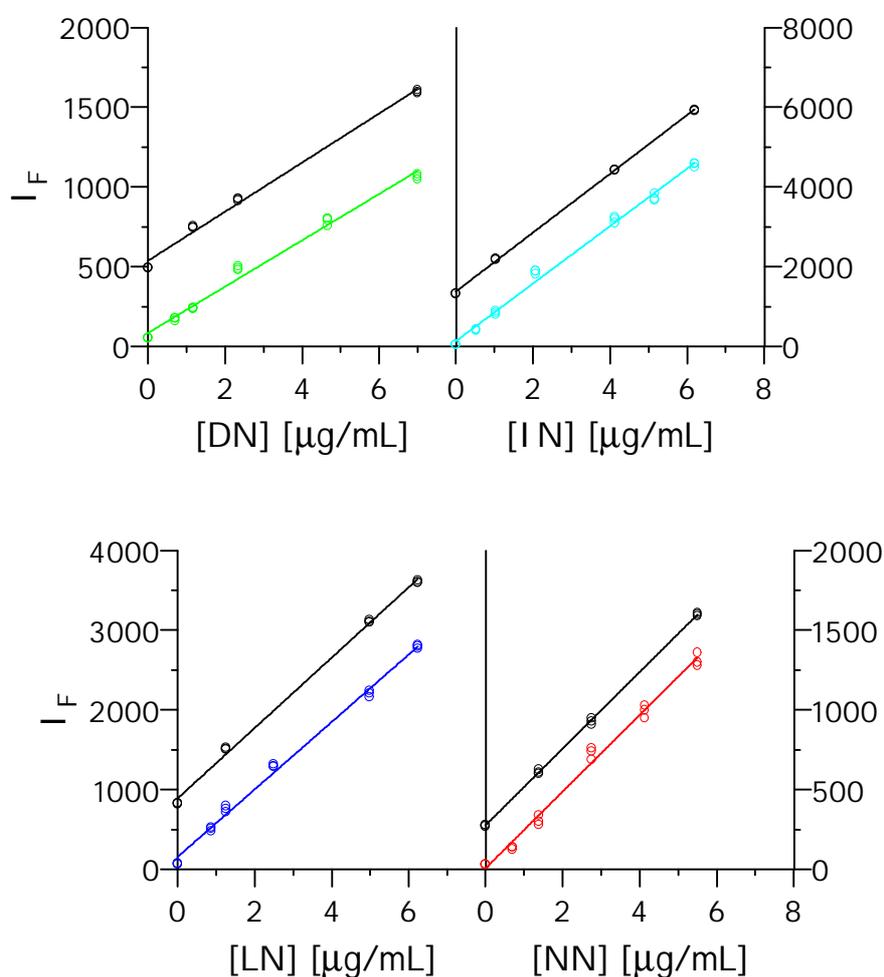


Figura III.B.3.10. - Rectas de calibrado y adición patrón.

DN, IN, LN y NN.

(\bullet) Adición patrón.

En la Tabla III.B.3.7 se muestran las ecuaciones de la recta correspondientes a la adición patrón de cada herbicida, así como los valores de t_{cal} y t_{tab} .

Tabla III.B.3.7.- Ecuaciones de la recta de la adición patrón, t_{cal} y t_{tab} de cada herbicida.

Compuesto	Ecuación de la recta	t_{cal}	t_{tab}
Diurón	$y = 154 C + 538$	1,602	2,173
I soproturón	$y = 738 C + 1378$	1,194	2,112
Linurón	$y = 442 C + 891$	1,842	2,165
Neburón	$y = 241 C + 276$	0,010	2,130

Al comprobarse que $t_{cal} \neq t_{tab}$, podemos concluir entonces que las pendientes no son significativamente distintas

En las Tablas III.B.3.8-9, se resumen los resultados de los análisis realizados por triplicado. Las recuperaciones obtenidas están comprendidas en un rango de 86 - 115.4 %, en el caso del agua del Sena, y de 91.2 - 112.7 %, en el agua potable y se pueden considerar satisfactorias.

La aplicación del test de Student, a estos datos de recuperación, indicó que los valores de "t" estaban comprendidos entre 0.13 y 3.86. Éstos son menores que el valor teórico de 4.303 (2 grados de libertad y nivel de confianza del 95 %), lo cual confirma la validación del método propuesto para la determinación de los herbicidas seleccionados en las muestras de agua.

Tabla III.B.3.8. - Recuperaciones obtenidas en agua de río contaminada.

Compuesto	C_{ad} (\pm g mL ⁻¹)	$C_{enc} \pm s^a$ (\pm g mL ⁻¹)	R (%)
Diurón	2,80	2,81 \pm 0,15	100,4
	4,20	4,13 \pm 0,04	98,3
	5,59	5,29 \pm 0,09	94,6
Isoproturón	1,65	1,56 \pm 0,01	94,5
	2,48	2,30 \pm 0,01	92,7
	3,30	3,03 \pm 0,03	91,8
Linurón	1,59	1,52 \pm 0,02	95,6
	2,39	2,18 \pm 0,05	91,2
	3,19	2,72 \pm 0,04	86,0
Neburón	1,10	1,27 \pm 0,02	115,4
	1,65	1,75 \pm 0,04	106,0
	2,20	2,12 \pm 0,06	96,4

Tabla III.B.3.9.- Recuperaciones obtenidas en agua potable contaminada.

Compuesto	C _{ad} (: g mL ⁻¹)	C _{enc} ± s ^a (: g mL ⁻¹)	R (%)
Diurón	2,80	2,84 ± 0,04	101,4
	4,20	4,21 ± 0,09	100,2
	5,59	5,56 ± 0,03	99,5
Isoproturón	1,65	1,75 ± 0,07	106,1
	2,48	2,53 ± 0,06	102,0
	3,30	3,26 ± 0,10	98,8
Linurón	1,59	1,45 ± 0,02	91,2
	2,39	2,18 ± 0,02	91,2
	3,19	2,98 ± 0,20	93,4
Neburón	1,10	1,24 ± 0,02	112,7
	1,65	1,60 ± 0,01	97,0
	2,20	2,09 ± 0,05	95,0

^aDesviación estándar de tres réplicas; C_{ad}: Concentración añadida;

C_{enc}: Concentración encontrada; R: Recuperación

III.B.3.9.- Método operatorio

Se propone el siguiente método operatorio:

Las muestras de agua son tratadas como se describe en la sección III.B.3.8.

Las rectas de calibrado se establecen preparando disoluciones patrón en matraces de 5.00 mL, en los que se introducen volúmenes crecientes de herbicida para que su concentración final esté comprendida dentro del rango de aplicación del

método. Se adiciona 1.0 mL de disolución tampón de pH 7, el volumen necesario de solución micelar para que la concentración de ésta sea de 8.0×10^{-2} M, SDS y 8.0×10^{-3} M, CTAC y por último, se enrasa con agua ultrapura. De forma análoga se preparan los blancos.

Alícuotas de estos patrones son irradiadas el tiempo optimizado y se realizan las medidas de intensidad de fluorescencia, a las longitudes de onda de excitación y emisión adecuadas. En la tabla III.B.3.10 se resumen los rangos de aplicación, longitudes de onda de excitación y emisión y los tiempos de irradiación a emplear con cada pesticida.

Tabla III.B.3.10.- Método operatorio.

COMPUESTO	Medio	Rango (: g mL ⁻¹)	$\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ (nm)	$t_{irr}^{óptimo}$ (min)
Diurón	CTAC, pH 7	1,9 - 7,0	318 /430	22
Isoproturón	SDS, pH 7	1,3 - 6,2	306 /436	25
Linurón	SDS, pH 7	1,2 - 6,2	320 /414	8
Neburón	CTAC, pH 7	1,3 - 5,5	308 /434	20

Los estudios realizados nos permiten concluir que la irradiación, con luz UV, de los herbicidas de la familia de las fenilureas seleccionadas, en medios micelares origina fotoproductos fuertemente fluorescentes.

Por otra parte, el uso de medios micelares da lugar a incrementos significativos de las señales de fluorescencia inducida fotoquímicamente de los herbicidas, e incrementa los tiempos óptimos de irradiación, comparados con los

resultados obtenidos en disoluciones acuosas.

Por último, utilizando este procedimiento fotoquímico, hemos establecido un método basado en la medida de PI F, simple y reproducible, adecuado para el análisis de residuos de estos herbicidas, en muestras de aguas. Se necesita un equipo de bajo costo, no es necesario un pretratamiento complicado y no se requiere aislamiento de los fotoproductos para realizar las aplicaciones analíticas.

III.B.3.10. - Bibliografía

- [1] M. De la Guardia, M.L. Hernández, S. Sancenon, J.L. Carrion, Coll. Surf., 48 (1990) 57
- [2] J.J. Aaron, A. Coly, Analyst, 121 (1996) 1545
- [3] J.J. Aaron, A. Coly, Talanta, 49 (1999) 107
- [4] M. Maafi, K. Taha-Bouamri, A. Bautista, J.J. Aaron, M.C. Mahedero, A. Muñoz de la Peña, F. Salinas, Biomed. Chromatogr., 13 (1999) 189
- [5] L. Cuadros Rodríguez, A.M. García Campaña, F. Alés Barrero, C. Jiménez Linares, M. Román Ceba, J. AOAC Int., 78 (1995) 471
- [6] A.M. García Campaña, L. Cuadros Rodríguez, J. Aybar Muñoz, F. Alés Barrero, J. AOAC Int., 80 (1997) 657

III.C.- ESTUDIO ESPECTROFLUORIMÉTRICO DE LOS HERBICIDAS FENOXIÁCIDOS (2,4-D, 2,4,5-T, MCPA, MCPP) Y PROPANIL

III.C.1.- Espectros de excitación y emisión

III.C.2.- Influencia del tiempo de irradiación y del pH

III.C.3.- Espectros de absorción de los herbicidas

III.C.4.- Influencia de la concentración de la disolución reguladora

III.C.5.- Estabilidad del fotoproducto

III.C.6.- Rectas de calibrado

III.C.6.1.- Ecuación de la recta y parámetros estadísticos

III.C.6.2.- Parámetros de fiabilidad. Repetitividad

III.C.7.- Método operatorio

III.C.8.- Bibliografía

g Este Estudio fue presentado como Comunicación en el Congreso: "Primer Simposio Electrónico de la Asociación Argentina de Químicos Analíticos (AAQA)". Argentina (2000). Título: "Estudio y determinación de herbicidas clorados mediante fluorescencia fotoinducida". Autores: A. Bautista-Sánchez, M. C. Mahedero, A. Muñoz de la Peña. Comunicación: 2

g También ha dado lugar al artículo: " Analysis of phenoxyacid herbicides and propanil by photochemically-induced fluorescence", M. C. Mahedero, A. Muñoz de la Peña, A. Bautista-Sánchez, (en preparación)

Como ya se ha reseñado en la introducción, los fenoxiácidos también son conocidos como hormonas de síntesis o fitohormonas. Éstos actúan en los vegetales penetrando por el tallo y las hojas, vías de acceso que le sirven para transportarse, junto con la savia, a todas las partes de la planta para producir así su destrucción.

Muchos de estos herbicidas persisten en el medio ambiente manteniéndose sin degradar, en el caso en el que no sean absorbidos por el suelo. Quedan, por tanto, en la superficie, se acumulan e incorporan a la cadena alimenticia, afectando al ser humano, de ahí el interés que hay en su estudio y determinación.

En cuanto a Propanil, es un herbicida que se aplica, principalmente, para destruir las malas hierbas de los cultivos de arroz.

III.C.1.- Espectros de excitación y emisión

Estudios anteriores [1] ponen de manifiesto que la máxima señal presentada por estos compuestos se obtiene en medio 2-PrOH y en medio metanólico. Trabajar con un 100% de estos disolventes no resulta aconsejable puesto que limita la aplicabilidad a muestras reales, en las que se hace necesaria la presencia de un cierto margen acuoso, por esta razón, trabajamos en medio alcohólico:agua (60:40), v/v.

Con el fin de localizar los máximos de emisión y excitación de cada uno de los herbicidas en estudio, se registraron los correspondientes espectros de disoluciones 5.0×10^{-6} M de cada uno de los herbicidas, tras ser irradiadas el tiempo indicado en cada caso. Los máximos obtenidos, en las condiciones instrumentales que se señalan, son los que se muestran en la Tabla III.C.1

- Sensibilidad = 700 V Rendijas = 4 nm
 Velocidad de barrido = 8 nm /s T^a de trabajo = 20 °C

Tabla III.C.1. - Longitudes de onda de excitación y emisión de los herbicidas en los dos medios estudiados.

COMPUESTO	2-PrOH:H ₂ O (60:40)		MeOH:H ₂ O (60:40)	
	$\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ (nm)	t _{irr} (min)	$\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ (nm)	t _{irr} (min)
2,4-D	273/298	14	273/299	7
2,4,5-T	273/298	5	273/299	5
MCPA	273/298	5	273/298	5
MCPP	273/298	8	273/298	5
Propanil	284/342	15	283/340	15
	372/458	10	372/458	10

Para hacer más fácil la visualización de las gráficas, a cada uno de los herbicidas se le asignará un color: 2,4-D (—), 2,4,5-T (—), MCPA (—), MCPP (—) y Propanil (—) $\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 372/458$ nm, (—) $\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 284/342$ nm.

Se comprueba que para un mismo tiempo de irradiación la señal de fluorescencia depende del disolvente empleado. Así, se obtienen señales mayores cuando el alcohol utilizado es 2-PrOH. A continuación, se realiza un estudio exhaustivo de la influencia que ejerce el tiempo de irradiación y el pH del medio en la señal de fluorescencia de cada herbicida, en los dos medios elegidos: MeOH:H₂O

y 2-PrOH:H₂O.

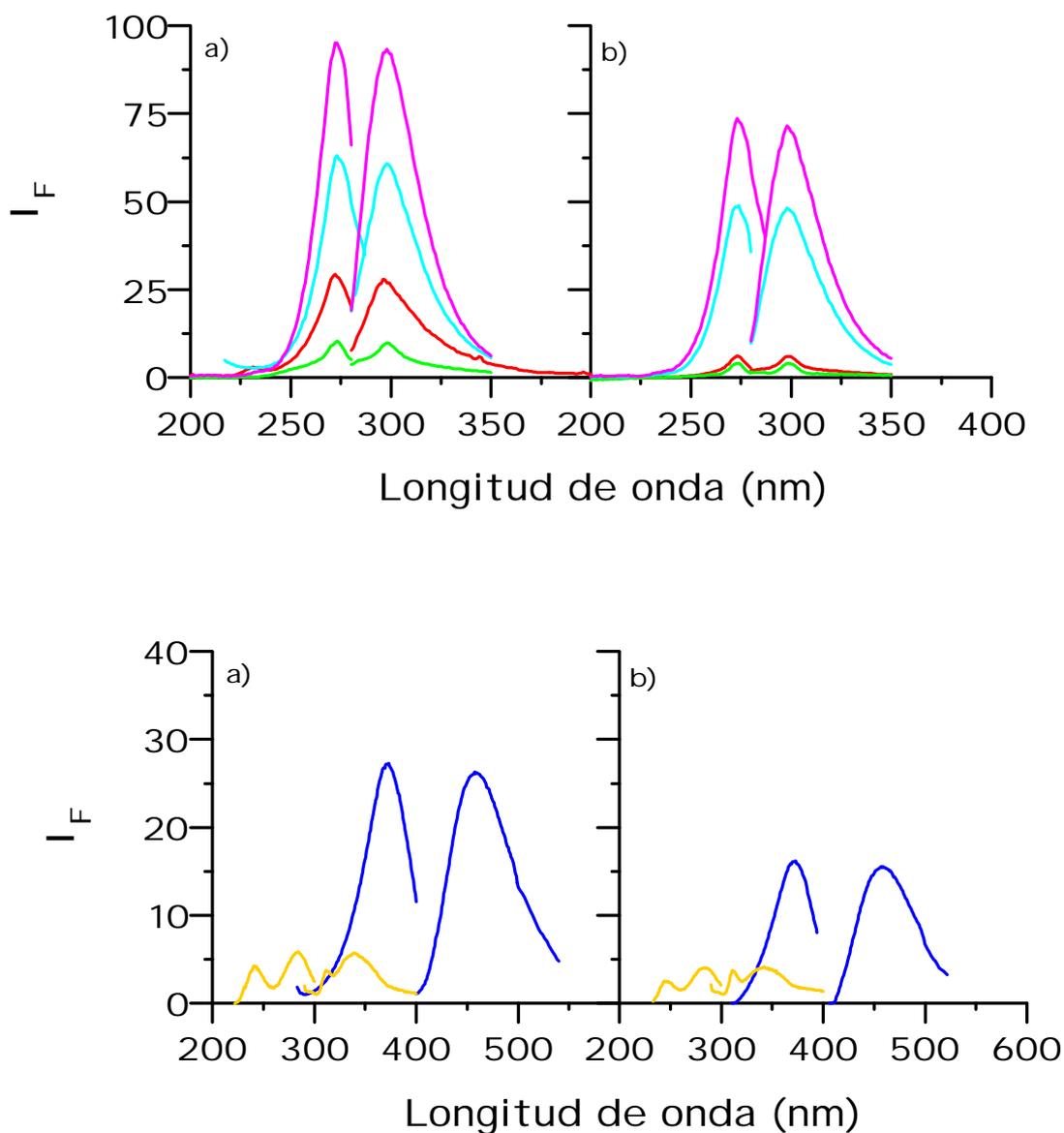


Figura III.C.1.- Espectros de excitación/emisión de 2,4-D (—), 2,4,5-T (—), MCPA (—), MCPP (—) y Propanil $\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 372/458$ nm (—), Propanil $\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 284/342$ nm (—).

a) 2-Propanol:agua (60:40), v/v, b) Metanol:agua (60:40), v/v.

III.C.2. - Influencia del tiempo de irradiación y del pH

Se preparan dos disoluciones madre de 200 : g mL^{-1} , una en medio 2-PrOH y otra en metanol, de cada uno de los herbicidas en estudio. A continuación, se toman tubos desechables de 5.00 mL en los que se mantiene constante una concentración de herbicida de 4.0 : g mL^{-1} , adicionando además 2.00 mL de la disolución tampón correspondiente y 2-PrOH o MeOH, en cada caso, hasta enrase.

Se fijan las longitudes de onda de excitación y emisión de cada compuesto y se comienzan las irradiaciones. Cada compuesto presenta longitudes de onda de excitación y emisión que son muy similares en los cuatro valores de pH ensayados, de ahí que siempre se consideren las mismas longitudes de onda, sea cual sea el pH.

En las Figuras III.C.2-6 se muestra la evolución de la señal de fluorescencia con el tiempo de irradiación en cada uno de los medios ensayados y con cada herbicida en concreto. Dado que el uso de tampones de pH es otro de los factores a tener en cuenta, se comprueba la influencia que ejercen tampones de pH 4, 5, 7 y 9.6, en la señal de fluorescencia. Los pH obtenidos, y que se indican en el pie de gráfica, son pH aparentes.

Se realiza la experiencia empleando disoluciones recién preparadas, cuya señal se compara con las señales obtenidas utilizando disoluciones que ya llevan tres días preparadas. Con ello, se pretende estudiar si el paso del tiempo influye en la señal de fluorescencia de las disoluciones madre. En la Parte superior de las Figuras, se representan las señales obtenidas con disoluciones recién preparadas (en colores),

y en la parte inferior de cada una, en negro, las correspondientes, pasados tres días desde su preparación.

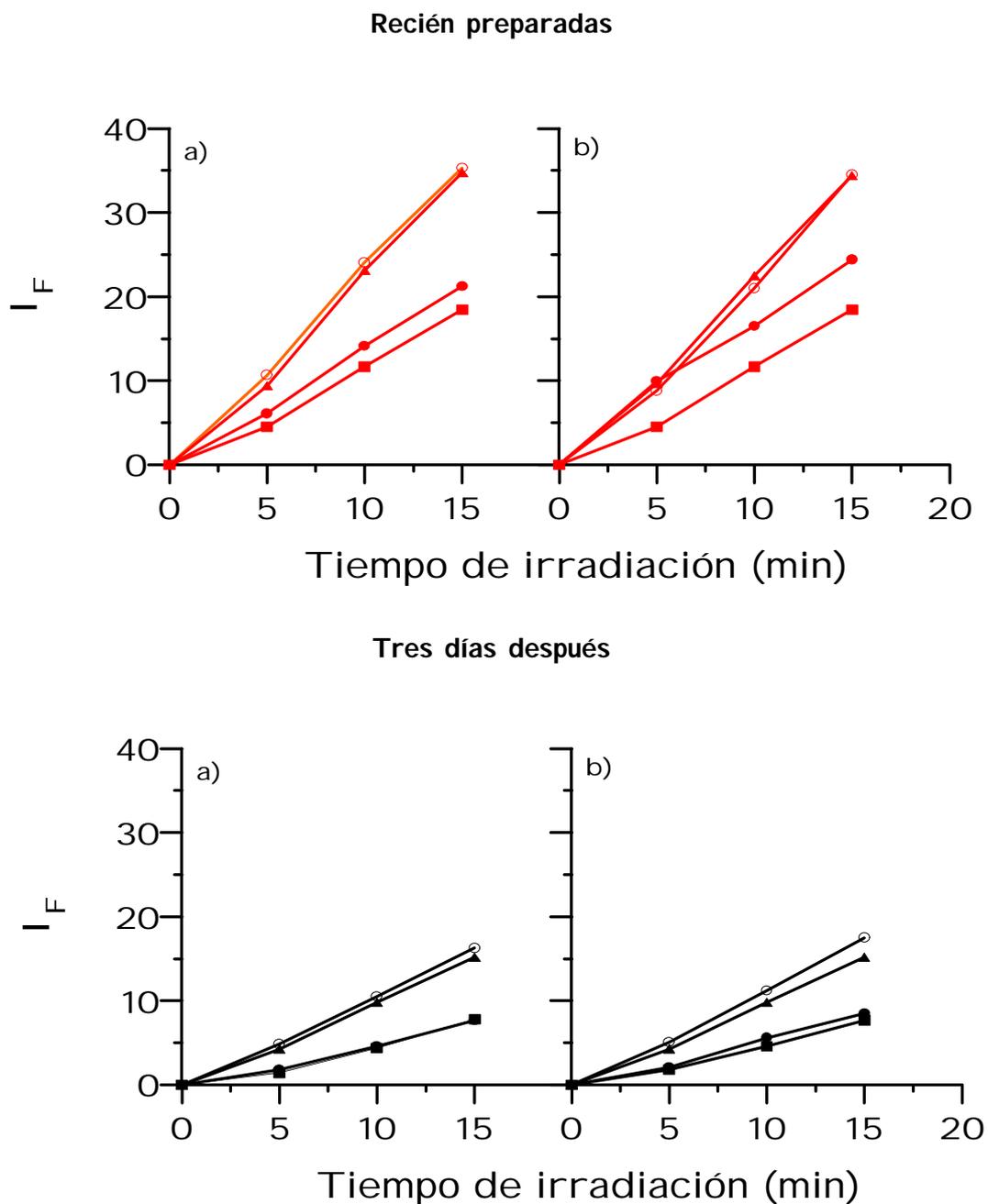


Figura III.C.2.- Influencia del tiempo de irradiación en la intensidad de

fluorescencia de $4.0 : \text{g mL}^{-1}$ de 2,4-D, en medio alcohol:tampón (60:40), v/v.

a) (#) pH = 5.3, (!) pH = 6.2, (") pH = 8.0, (•) pH = 9.2 (2-PrOH:tampón)

b) (#) pH = 5.0, (!) pH = 6.0, (") pH = 8.4, (•) pH = 9 (MeOH:tampón)

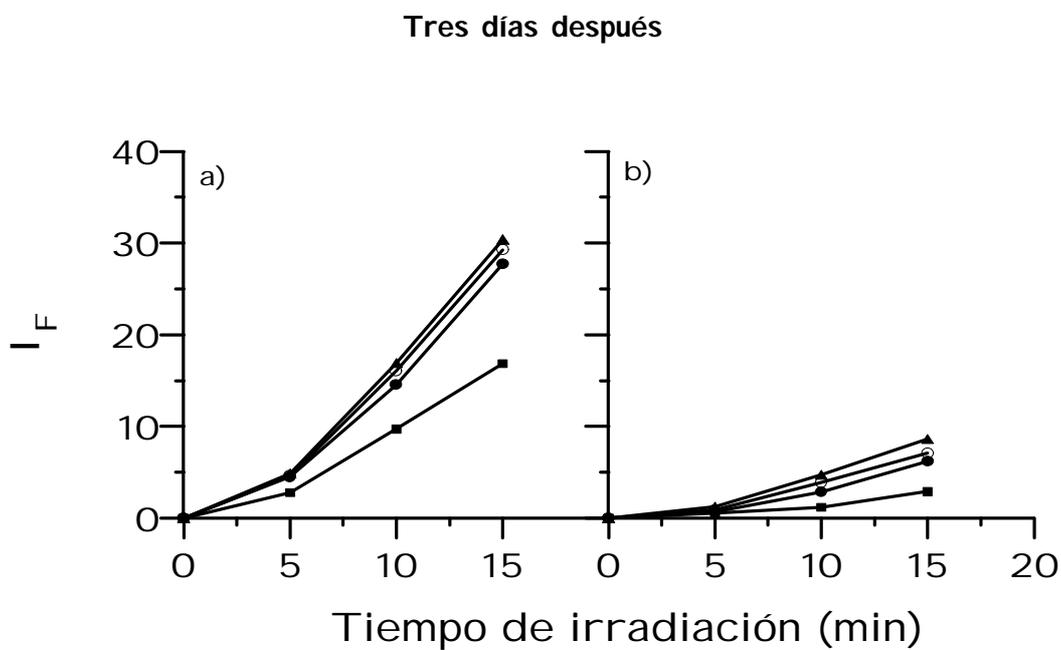
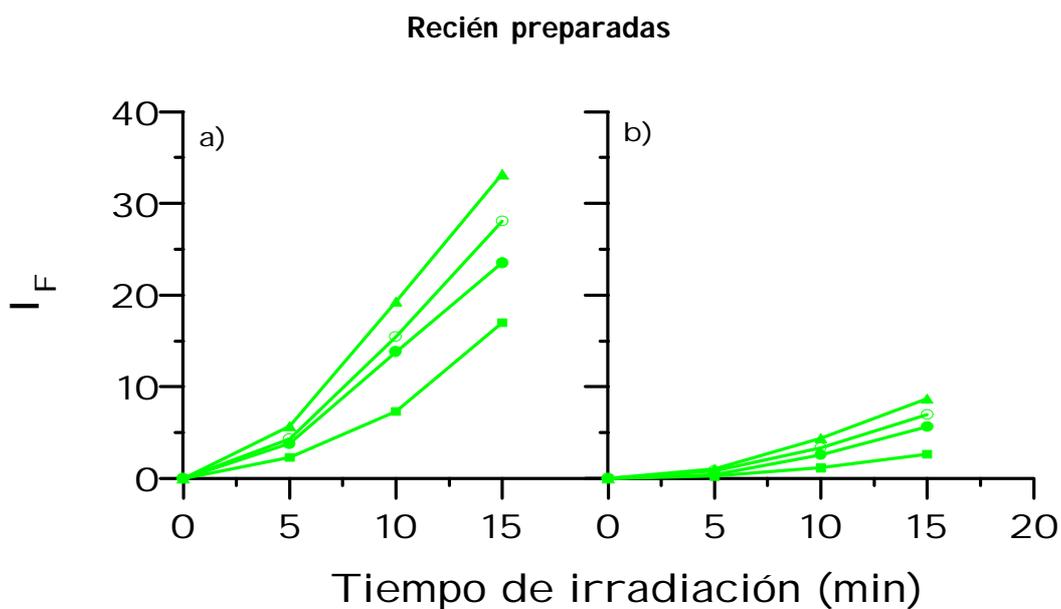
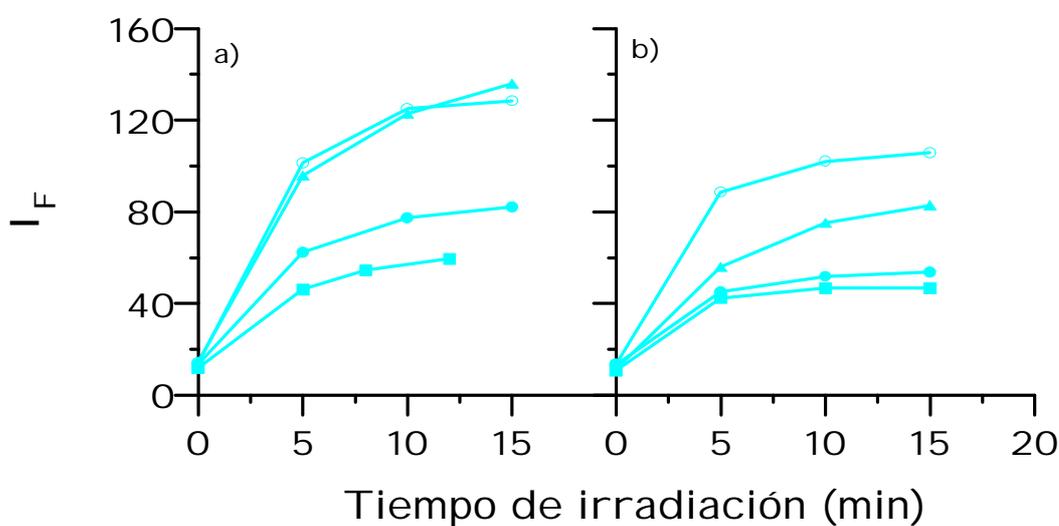


Figura III.C.3.- Influencia del tiempo de irradiación en la intensidad de fluorescencia de 4.0 : g mL^{-1} de 2,4,5-T, en medio alcohol:tampón (60:40), v/v.

a) (#) pH = 5.3, (!) pH = 6.2, (") pH = 8.0, (•) pH = 9.2 (2-PrOH:tampón)

b) (#) pH = 5.0, (!) pH = 6.0, (") pH = 8.4, (•) pH = 9 (MeOH:tampón)

Recién preparadas



Tres días después

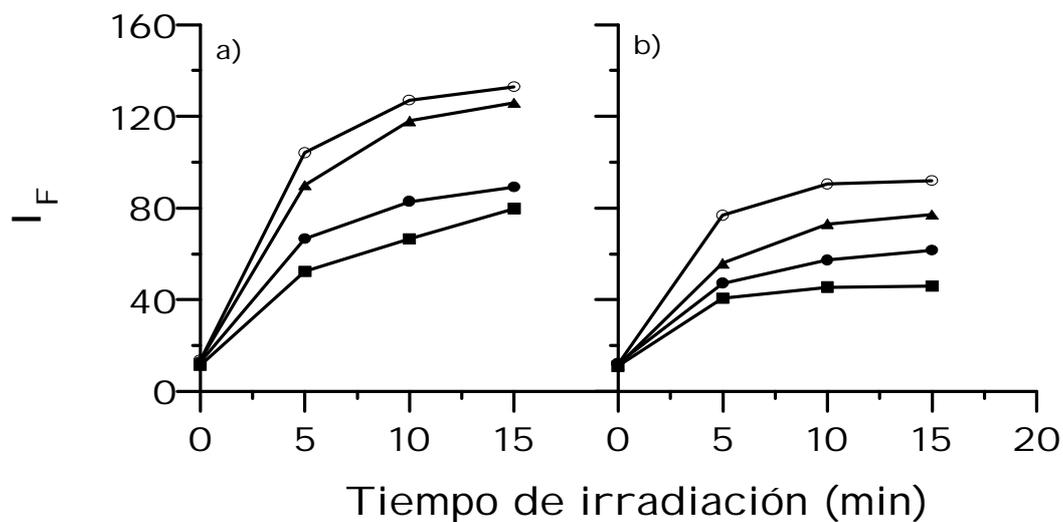


Figura III.C.4.- Influencia del tiempo de irradiación en la intensidad de fluorescencia de 4.0 g mL^{-1} de MCPA, en medio alcohol:tampón (60:40), v/v.

a) (#) pH = 5.3, (!) pH = 6.2, (") pH = 8.0, (•) pH = 9.2 (2-PrOH:tampón)

b) (#) pH = 5.0, (!) pH = 6.0, (") pH = 8.4, (•) pH = 9 (MeOH:tampón)

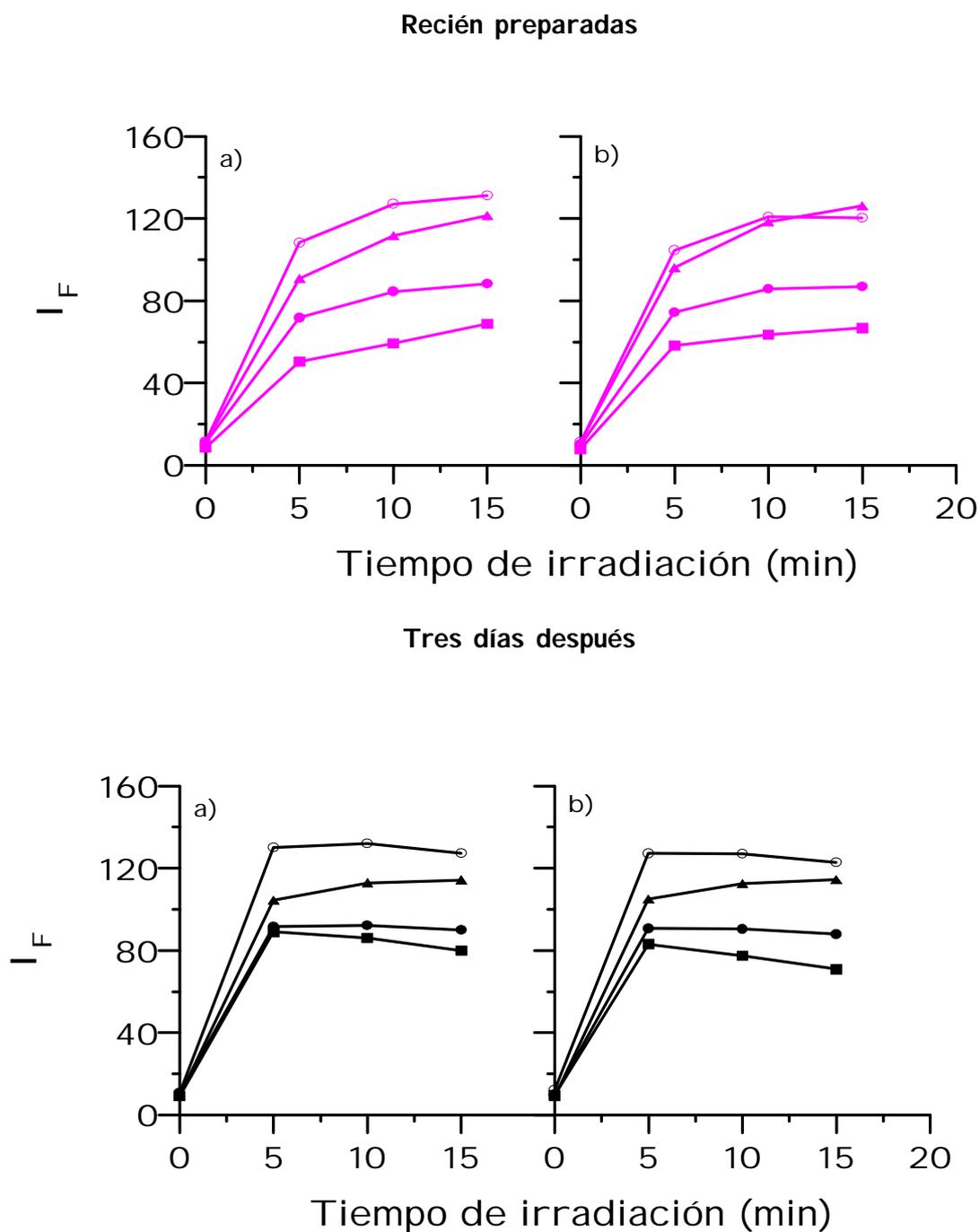


Figura III.C.5.- Influencia del tiempo de irradiación en la intensidad de fluorescencia de 4.0 g mL^{-1} de MCPP, en medio alcohol:tampón (60:40), v/v.

a) (#) pH = 5.3, (!) pH = 6.2, (") pH = 8.0, (•) pH = 9.2 (2-PrOH:tampón)

b) (#) pH = 5.0, (!) pH = 6.0, (") pH = 8.4, (•) pH = 9 (MeOH:tampón)

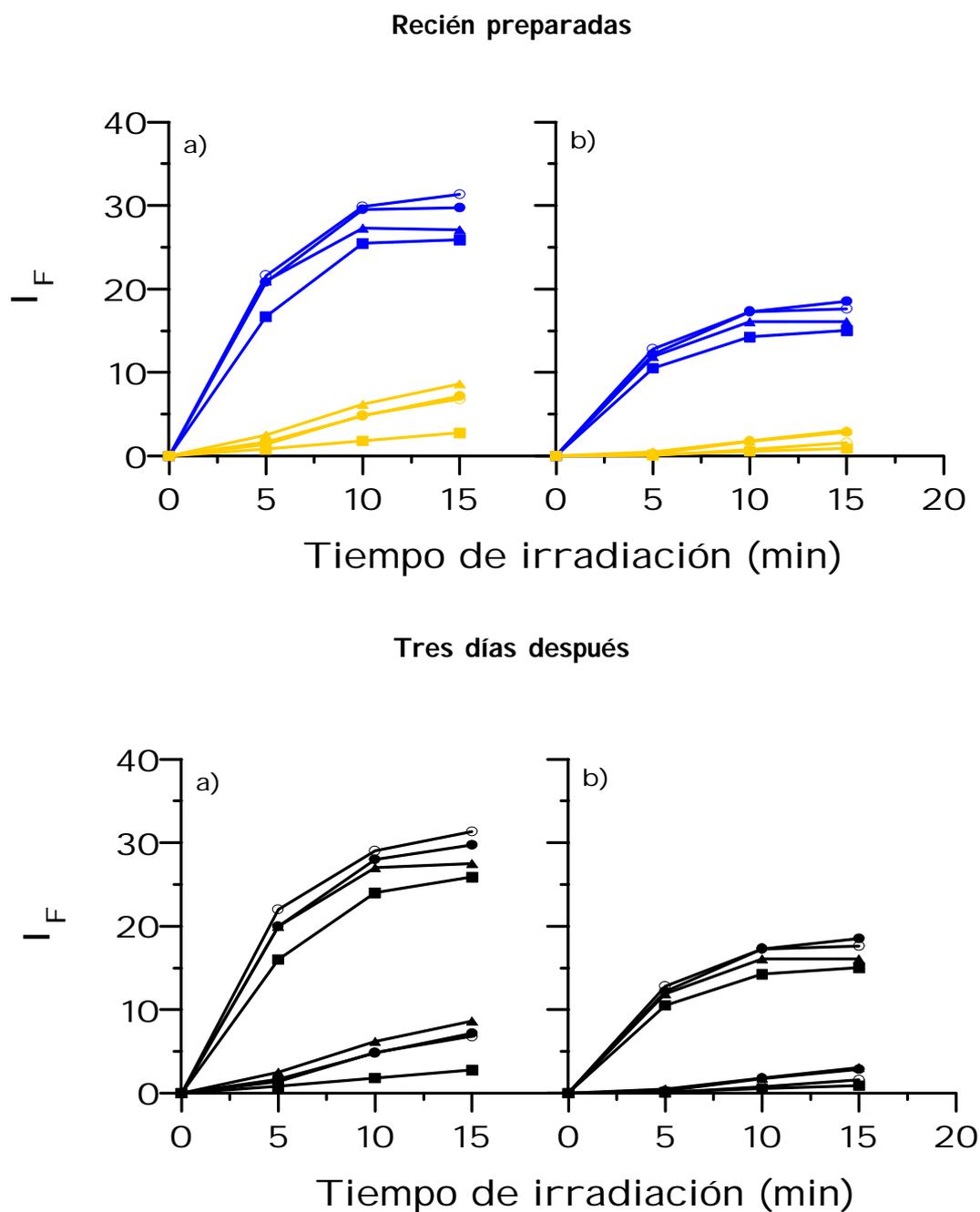


Figura III.C.6.- Influencia del tiempo de irradiación en la intensidad de fluorescencia de $4.0 : \text{g mL}^{-1}$ de Propanil, $\lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{em}} = 372/458 \text{ nm}$ (—), $\lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{em}} = 284/342 \text{ nm}$ (—), en medio alcohol:tampón (60:40), v/v.

a) (#) pH = 5.3, (!) pH = 6.2, (") pH = 8.0, (•) pH = 9.2 (2-PrOH:tampón)

b) (#) pH = 5.0, (!) pH = 6.0, (") pH = 8.4, (•) pH = 9 (MeOH:tampón)

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto:

g La existencia de dos tipos de curvas: en la primera de ellas, para 2,4-D, 2,4,5-T y Propanil ($\lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{em}} = 284/342 \text{ nm}$), la señal de fluorescencia aumenta con el tiempo de irradiación, sin alcanzar un máximo. En la otra, se produce un aumento de la señal de fluorescencia en los primeros minutos de irradiación, alcanzándose, posteriormente, una meseta. Este comportamiento lo presentan MCP, MCPA y Propanil ($\lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{em}} = 372/458 \text{ nm}$).

g El mejor disolvente es 2-PrOH:tampón en comparación con MeOH:tampón, por ello se trabajará con 2-PrOH.

g El tampón de pH que da lugar a mayores valores de la intensidad de fluorescencia es el de pH = 7, pH aparente 8, de ahí que las siguientes experiencias se lleven a cabo a ese pH.

g Se toma 10 minutos como tiempo óptimo de irradiación para MCP, MCPA y Propanil. En el caso de los otros herbicidas, con los que no se alcanza la zona de meseta en un tiempo razonable, se decide trabajar también con 10 minutos de irradiación, para evitar que el método que se establezca sea excesivamente largo.

g Las disoluciones deben ser preparadas a diario, ya que se ha comprobado que el transcurso del tiempo produce una disminución en la señal de fluorescencia, especialmente significativo en el caso de 2,4-D. Las disoluciones de Propanil prácticamente no se ven afectadas por este parámetro.

III.C.3.- Espectros de absorción de los herbicidas

A continuación, en la Figura III.C.7 se muestran los espectros de absorción de las disoluciones de herbicidas en medio 2-PrOH:tampón y MeOH:tampón, al pH elegido como óptimo, adición de tampón de pH 7 (pH aparente de 8). Con esta experiencia se demuestra que los espectros de absorción de los herbicidas estudiados varían con la irradiación, lo que significa que se forman otras especies, siendo algunas de ellas las que emiten las señales fluorescentes que determinamos.

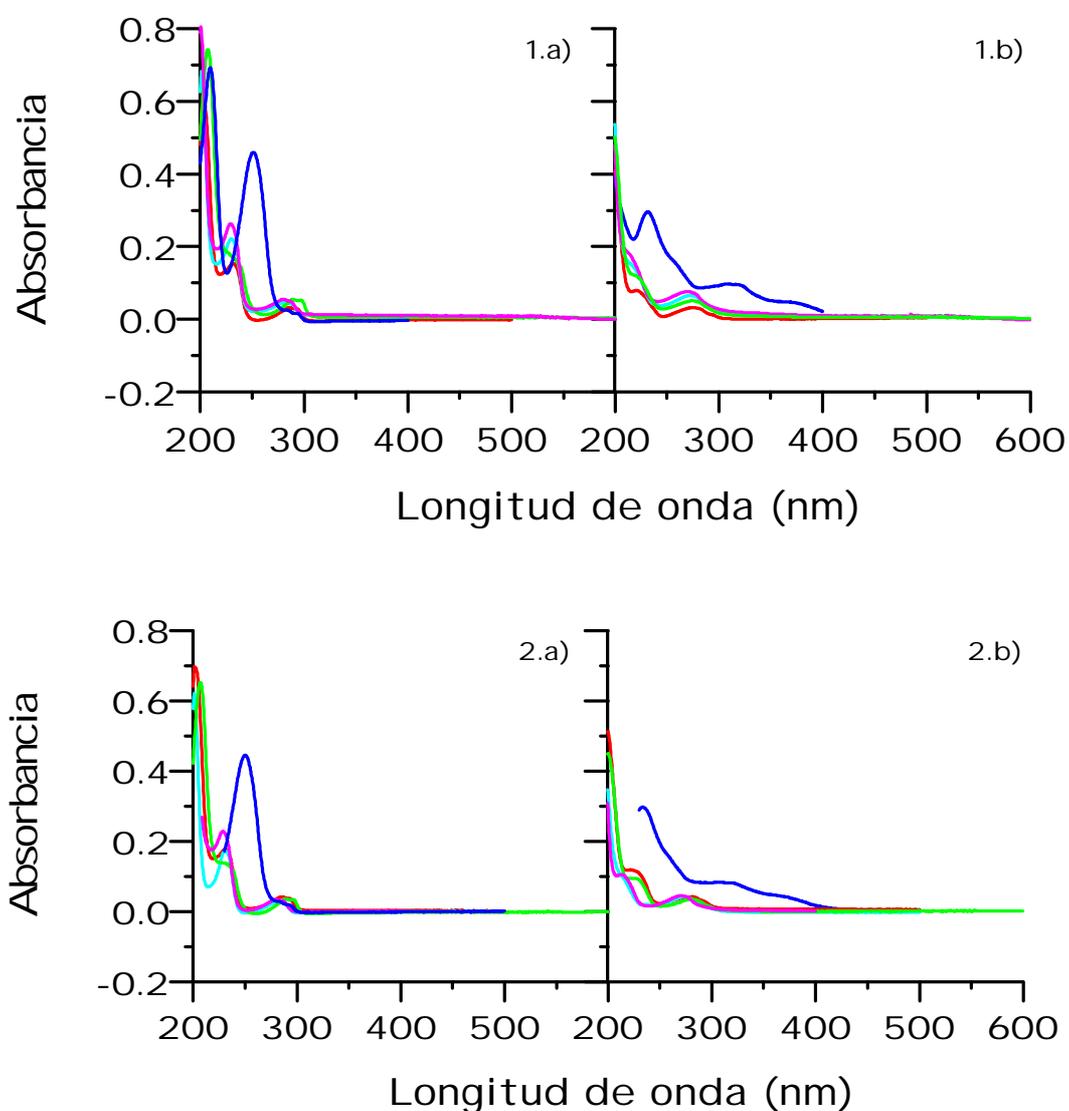


Figura III.C.7.- Espectros de absorbancia de 2,4-D (—), 2,4,5-T (—), MCPA (—), MCPP (—) y Propanil (—).

a) sin ser irradiados, b) irradiando 15 minutos.

1) Medio 2-PrOH:tampón pH 7.

2) Medio MeOH:tampón pH 7.

III.C.4.- Influencia de la concentración de la disolución reguladora

Con objeto de fijar el volumen de disolución reguladora de pH, anteriormente elegido como óptimo, se prepara una disolución madre de NaOH / NaH₂PO₄ pH 7.0 y C = 0.5 M. Para comprobar cómo influye la concentración de esta disolución reguladora en la intensidad de fluorescencia, preparamos disoluciones de los herbicidas en concentraciones de 4.0 : g mL⁻¹, empleando tubos desechables de 5.00 mL. Se adiciona 2.9 mL de 2-PrOH:agua (60:40),v/v, volúmenes variables de disolución reguladora y agua ultrapura hasta enrase.

Se comprobó que cuando la disolución reguladora tenía una concentración superior a 0.2 M, se formaba cierta turbidez en la disolución, por lo que se decide trabajar con una disolución madre de concentración inferior a 0.2 M. Se varió la concentración final de la disolución reguladora desde 0.01 M hasta 0.1 M, obteniéndose resultados que indicaban que la señal de fluorescencia es máxima y permanece prácticamente constante en el intervalo de concentraciones de 0.01 a 0.04 M, disminuyendo ligeramente para concentraciones superiores a este último.

Para posteriores estudios, se elige como concentración óptima de disolución reguladora 0.02 M, que se consigue por adición de 1.00 mL de tampón NaOH/NaH₂PO₄, 0.1 M en NaH₂PO₄, de pH 7.0, en un volumen final de 5.00 mL.

III.C.5. - Estabilidad del fotoproducto

Se estudia el tiempo al que debe realizarse la medida de fluorescencia, una vez efectuados los 10 minutos de irradiación, así como la estabilidad que presenta el fotoproducto formado.

Se somete a 10 minutos de irradiación una disolución que, en un volumen final de 5.00 mL, contiene 4.0 g mL^{-1} de Propanil, en medio 2-PrOH:tampón de pH 7 y concentración 0.1 M (60:40), v/v. Al estudiar la estabilidad en función del tiempo que presentaba la disolución, se comprobó que durante los 3 primeros minutos hay un pequeño aumento de la señal, permaneciendo prácticamente constante en los minutos siguientes.

El comportamiento encontrado para los otros herbicidas es similar, aunque la obtención de la estabilidad se encuentra transcurrido un minuto desde que se coloca en la celda de medida, tal y como se puede observar en la Figura III.C.8.

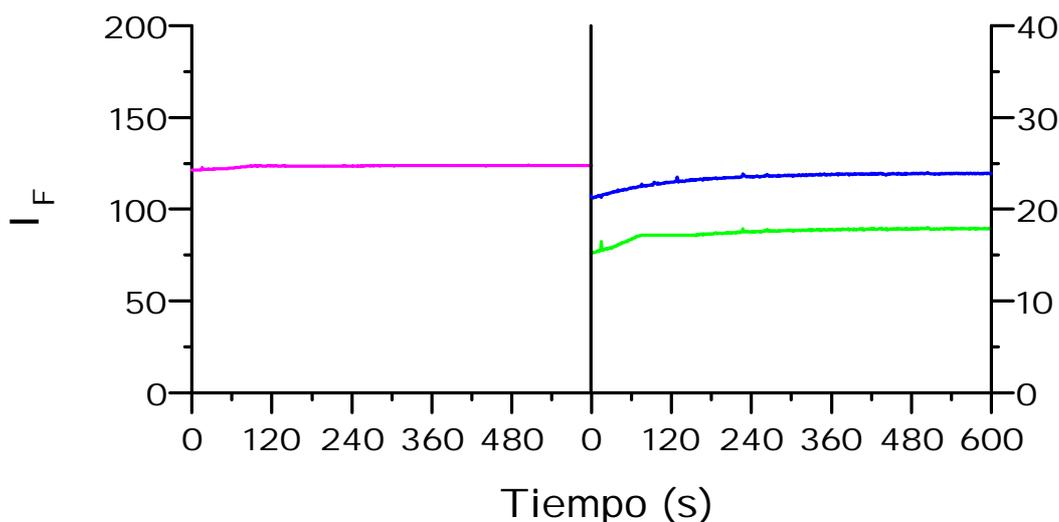


Figura III.C.8. - Estabilidad del fotoproducto formado a lo largo del tiempo.

MCPP, Propanil y 2,4,5-T.

Los otros herbicidas, 2,4-D y MCPA, se comportan igual que 2,4,5-T y MCPP. Por lo que en posteriores experiencias, con objeto de evitar irreproducibilidades, se espera 3 minutos, en el caso de Propanil, y 1 minuto, con los otros herbicidas, antes de realizar el registro del espectro de emisión.

Como ya se ha indicado, el aumento de la señal podría deberse a la diferencia de temperatura que presenta la disolución antes y después de ser introducida en el espectrofluorímetro.

III.C.6.- Rectas de calibrado

Una vez establecidas las condiciones químicas e instrumentales para la determinación de los herbicidas, se procedió al establecimiento de las rectas de calibrado con objeto de comprobar el rango de linealidad existente entre la concentración del analito y la señal de fluorescencia. Para ello, en tubos desechables de 5.00 mL, se prepararon series de muestras por triplicado que contenían:

- cantidades variables de disolución de herbicida en medio 2-propanólico.
- 1.00 mL de la disolución reguladora NaOH/NaH₂PO₄, 0.1 M en NaH₂PO₄ de pH 7.0
- 1.00 mL de agua ultrapura
- 2-PrOH hasta enrase.

Las condiciones instrumentales que se emplearon fueron:

- | | |
|---|---|
| <input type="radio"/> Sensibilidad = 650 V | <input type="radio"/> Rendijas = 4 nm |
| <input type="radio"/> Velocidad de barrido = 8 nm/s | <input type="radio"/> T ^a de trabajo = 20 °C |

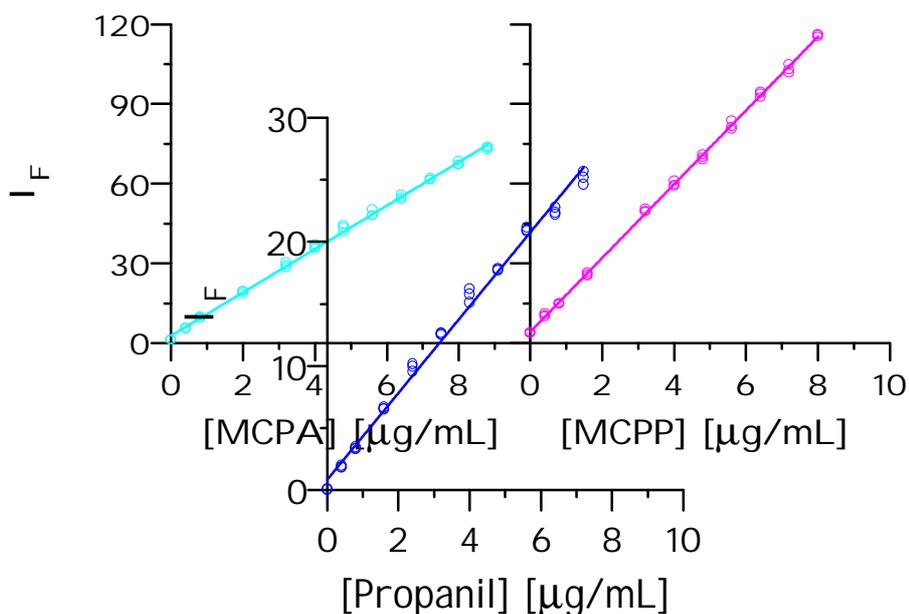
En el caso del MCPA la sensibilidad fue de 600 V.

Análogamente, se preparan blancos exentos de herbicida. Se registraron los espectros de emisión, excitando en cada caso a la longitud de onda correspondiente al herbicida estudiado. Se miden las señales analíticas cuyos valores se representan frente a la concentración puesta de cada herbicida.

III.C.6.1.- Ecuación de la recta y parámetros estadísticos

En todos los casos se obtuvieron líneas rectas ajustadas por el método de mínimos cuadrados, tal y como se muestra en la Figura III.C.9.

Además, se investigó la influencia que ejercía la presencia de un segundo herbicida en la determinación del primero. Así, se pone de manifiesto que es posible la determinación de Propanil en presencia de cualquier otro de los compuestos estudiados, no siendo posible la determinación de los otros en presencia de Propanil. En todos los casos se trabajó con una concentración de interferente de 4.0 g mL^{-1} .



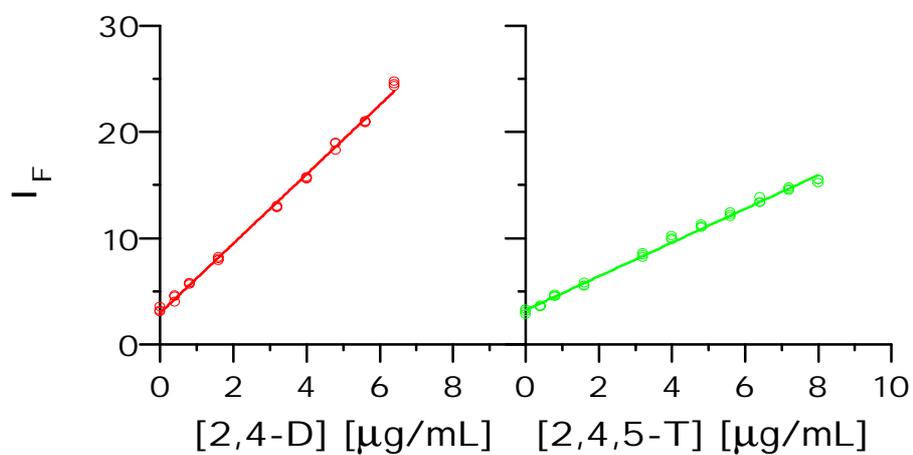


Figura III.C.9. - Rectas de calibrado.

En las Tablas III.C.2-4 se recogen los parámetros estadísticos para cada herbicida.

Tabla III.C.2. - Parámetros estadísticos obtenidos para 2,4-D y 2,4,5-T.

	2,4-D	2,4,5-T
Ordenada en el origen: a	2,98	3,31
Desviación estándar de a: s_a	0,13	0,10
Desviación estándar relativa de a: DER (a) (%)	4,30	3,13

	2,4-D	2,4,5-T
Pendiente: b	3,26	1,57
Desviación estándar de b : s_b	0,03	0,02
Desviación estándar relativa de b : DER (b) (%)	1,06	1,34
Desviación estándar de regresión: $s_{y,x}$	0,40	0,30
Coefficiente de correlación: r	0,999	0,997
Coefficiente de determinación: r^2	0,997	0,995

Tabla III.C.3. - Parámetros estadísticos obtenidos para MCPA y MCPP.

	MCPA	MCPP
Ordenada en el origen: a	3,23	4,26
Desviación estándar de a : s_a	0,42	0,33
Desviación estándar relativa de a : DER (a) (%)	12,9	7,9
Pendiente: b	8,00	13,88
Desviación estándar de b : s_b	0,07	0,07
Desviación estándar relativa de b : DER (b) (%)	0,92	0,51
Desviación estándar de regresión: $s_{y,x}$	1,45	1,11
Coefficiente de correlación: r	0,998	1,00
Coefficiente de determinación: r^2	0,997	0,999

Tabla III.C.4. - Parámetros estadísticos obtenidos para Propanil.

	Propanil
Ordenada en el origen: a	0,95

	Propanil
Desviación estándar de a: s_a	0,23
Desviación estándar relativa de a: DER (a) (%)	24,4
Pendiente: b	3,47
Desviación estándar de b: s_b	0,05
Desviación estándar relativa de b: DER (b) (%)	1,57
Desviación estándar de regresión: $s_{y,x}$	0,68
Coefficiente de correlación: r	0,997
Coefficiente de determinación: r^2	0,993

III.C.6.2.- Parámetros de fiabilidad. Repetitividad

En las Tablas III.C.5-7 se recogen los parámetros de fiabilidad obtenidos para cada uno de los herbicidas estudiados.

Tabla III.C.5. - Parámetros de fiabilidad aplicando el modelo de regresión lineal para [Propanil](#).

	Propanil
Linealidad (1- $DER(b)$) %	98,4
Sensibilidad analítica (\pm g mL ⁻¹)	0,20
Desviación estándar del blanco	0,13
Límite de determinación (\pm g mL ⁻¹)	1,30
LD, Clayton (\pm g mL ⁻¹)	0,45
LD, Winefordner y Long (\pm g mL ⁻¹)	0,17

Tabla III.C.6. - Parámetros de fiabilidad aplicando el modelo de regresión lineal para 2,4-D y 2,4,5-T.

	2,4-D	2,4,5-T
Linealidad (1-DER (b)) %	98,9	98,7
Sensibilidad analítica (∴ g mL ⁻¹)	0,12	0,19
Desviación estándar del blanco	0,08	0,13
Límite de determinación (∴ g mL ⁻¹)	0,80	1,30
LD, Clayton (∴ g mL ⁻¹)	0,27	0,44
LD, Winefordner y Long (∴ g mL ⁻¹)	0,12	0,21

Tabla III.C.7. - Parámetros de fiabilidad aplicando el modelo de regresión lineal para MCPA y MCPP.

	MCPA	MCPP
Linealidad (1-DER (b)) %	99,0	99,5
Sensibilidad analítica (∴ g mL ⁻¹)	0,18	0,08
Desviación estándar del blanco	0,12	0,05
Límite de determinación (∴ g mL ⁻¹)	1,20	0,50
LD, Clayton (∴ g mL ⁻¹)	0,39	0,18
LD, Winefordner y Long (∴ g mL ⁻¹)	0,16	0,07

En la Figura III.C.10 se representan los valores de precisión para cada concentración de analito empleada en el calibrado.

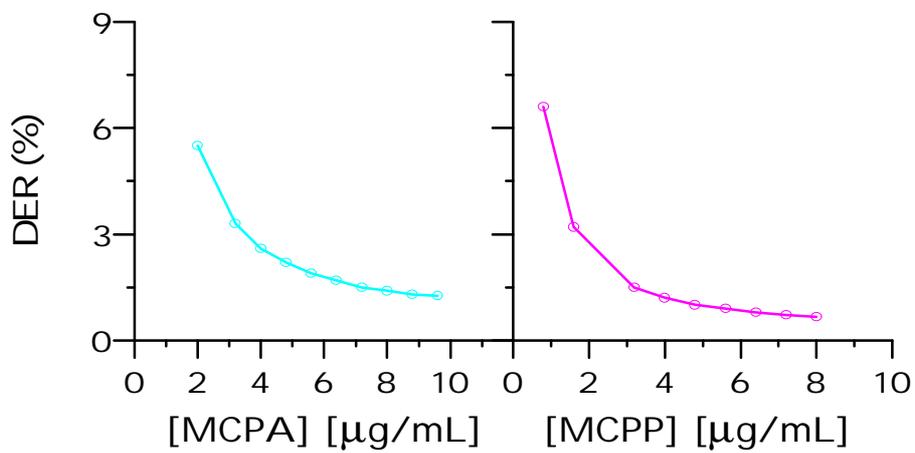
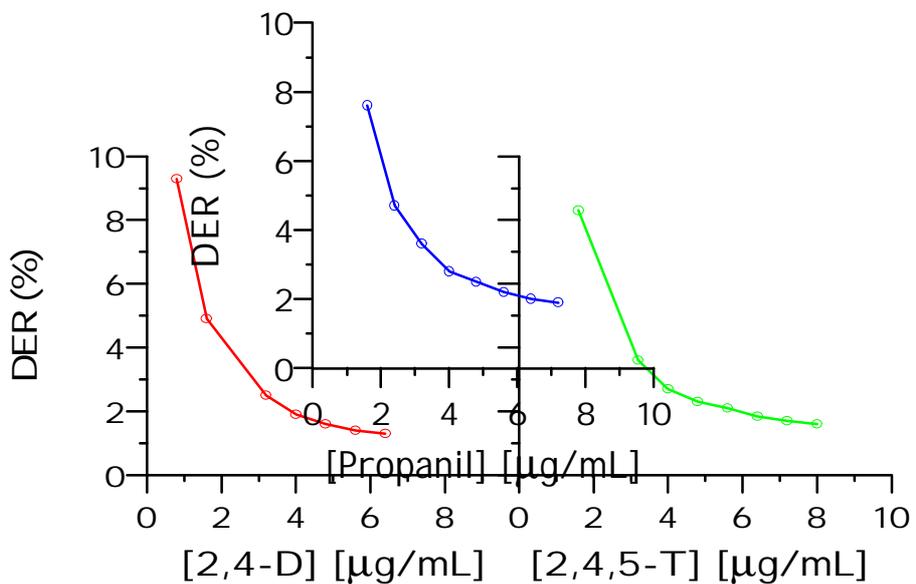


Figura III.C.10. - Desviaciones estándar relativas de cada herbicidas.

III.C.7.- Método operatorio

Como consecuencia del estudio realizado se propone el siguiente método operatorio. En matraces de 5.00 mL, se introducen volúmenes crecientes de herbicida para que su concentración final esté comprendida dentro del rango de aplicación del método. Se adiciona 1.00 mL de disolución reguladora NaOH/NaH₂PO₄, 0.1 M en NaH₂PO₄ de pH 7; 1.00 mL de agua ultrapura y se enrasa con 2-PrOH. De forma análoga se prepara el blanco.

Alícuotas de estos patrones son irradiadas durante 10 minutos y se realizan las medidas de intensidad de fluorescencia, a las longitudes de onda de excitación y emisión adecuadas.

En la Tabla III.C.8 se resumen los rangos de aplicación y longitudes de onda de excitación y emisión a emplear con cada pesticida.

Tabla III.C.8. - Método operatorio.

COMPUESTO	Rango (: g mL ⁻¹)	$\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ (nm)
2,4-D	1,6 - 8,0	273/298
2,4,5-T	0,8 - 6,4	273/298

COMPUESTO	Rango (: g mL ⁻¹)	$\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ (nm)
MCPA	2,0 - 9,6	273/298
MCPP	0,8 - 8,0	273/298
Propanil	1,6 - 7,2	372/458

Una vez comprobada la posibilidad de determinar Propanil en presencia de los otros herbicidas y no a la inversa, se decide no aplicar este método a muestras reales, dado que, a continuación, se pretende realizar la determinación de todos ellos mediante HPLC, que resulta más interesante.

III.C.8. - Bibliografía

[1] S. A. Eremin, B. Laasis, J. J. Aaron, Talanta, 43 (1996) 295

IV.1.- FENILUREAS

IV.1.A.- MEZCLAS TERNARIAS

IV.1.A.1.- Generalidades de la cromatografía

IV.1.A.2.- Elección de la fase móvil

g (DN-LN-NN)

IV.1.A.3.- Condiciones de trabajo

IV.1.A.4.- Elección del caudal

IV.1.A.5.- Influencia del pH y la concentración de disolución tampón

IV.1.A.6.- Espectros de excitación y emisión

IV.1.A.7.- Rectas de calibrado

IV.1.A.7.1.- Ecuación de la recta de calibrado y parámetros estadísticos

IV.1.A.7.2.- Parámetros de fiabilidad. Repetitividad

g (IN-LN-NN)

IV.1.A.8.- Influencia del caudal

IV.1.A.9.- Espectros de excitación y emisión

IV.1.A.10.- Rectas de calibrado

IV.1.A.10.1.- Ecuación de la recta de calibrado y parámetros estadísticos

IV.1.A.10.2.- Parámetros de fiabilidad. Repetitividad

IV.1.A.11.- Aplicación del método propuesto a la determinación y separación de fenilureas en agua

IV.1.A.12.- Método operatorio

IV.1.B. - MEZCLA BINARIA (IN-DN)

IV.1.B.1.- Elección de la fase móvil

IV.1.B.2.- Espectros de excitación y emisión

IV.1.B.3.- Rectas de calibrado

IV.1.B.3.1.- Ecuación de la recta de calibrado y parámetros estadísticos

IV.1.B.3.2.- Parámetros de fiabilidad. Repetitividad

IV.1.B.4.- Aplicación del método propuesto a la determinación y separación de la mezcla binaria en agua

IV.1.B.5.- Bibliografía

g Este Estudio fue presentado como Comunicación en el Congreso: "XXX Scientific Meeting of the Group of Chromatography and Related Techniques and I Meeting of the Spanish Society of Chromatography and Related Techniques", Valencia, España (2001). Título: "Determinación cromatográfica de varias fenilureas empleando fluorescencia fotoinducida como método de detección". Autores: A. Bautista-Sanchez, M. C. Mahedero, A. Muñoz de la Peña. Comunicación: AMB-2

g También ha dado lugar al artículo: "High performance liquid chromatographic determination of phenylureas by photochemically-induced fluorescence detection", A. Muñoz de la Peña, M.C. Mahedero, A. Bautista-Sánchez, J. Chromatog. A. (2001), (enviado).

IV.1.A.1.- Generalidades de la cromatografía

La Cromatografía es hoy por hoy la principal técnica analítica de separación, aplicable a cualquier mezcla soluble o volátil. En concreto, la Cromatografía Líquida (CL) lleva siendo utilizada durante bastante tiempo y consiste en la introducción de una mezcla de compuestos en la columna, siendo eluidos los distintos componentes de dicha mezcla con un disolvente adecuado o una serie de disolventes. Cuando uno de los componentes de la mezcla se adsorbe débilmente a la superficie del sólido de la fase estacionaria, viajará más rápidamente que otros solutos que sean adsorbidos más fuertemente por la fase estacionaria. De ese modo, la separación de los solutos que componen la mezcla se hace posible gracias a las diferencias de adsorción sobre el sólido que constituye la fase estacionaria. A este método se le denomina Cromatografía de Adsorción o Cromatografía Líquido Sólido (CLS).

En Cromatografía Líquido-Líquido (CLL), técnica empleada en este estudio, la fase estacionaria es un soporte sólido, inerte y finamente dividido y cubierto por un líquido. Las separaciones se basan en los diferentes coeficientes de reparto de los analitos entre la fase estacionaria líquida y la fase móvil. En la CLL de fase normal, la fase estacionaria es relativamente polar y la fase móvil relativamente no polar; por el contrario, en CLL en fase reversa, la fase estacionaria es no polar y la fase móvil es polar. Otras cromatografías incluyen la Cromatografía de Exclusión y la Cromatografía de Cambio Iónico.

La cromatografía está regida por factores termodinámicos y cinéticos, y aunque ambos influyen en todo el proceso cromatográfico, son los termodinámicos los que básicamente determinan la situación de los picos, mientras que los cinéticos

influyen en el ensanchamiento de los mismos.

Los **aspectos termodinámicos** son los que determinan las características de retención y selectividad del sistema cromatográfico y corresponden a los equilibrios de distribución del soluto entre la fase móvil y la fase estacionaria. En lo que a los **aspectos cinéticos** se refiere, éstos consideran el tiempo para el que se alcanzan los sucesivos equilibrios entre las fases, durante el tiempo de contacto, y la velocidad de desplazamiento diferencial de la mezcla de solutos en el lecho cromatográfico.

En CL clásica, se utilizaba una columna de cristal en la que se introducía la fase estacionaria y a través de la cual se hacía pasar el eluyente. El inconveniente de esta técnica era que, en muchos casos, las columnas sólo se podían usar una vez y era necesaria la introducción de una nueva fase estacionaria para cada analito.

En CLL, la fase móvil debía estar saturada con la fase estacionaria para evitar la redisolución de la misma en la columna. Además, muchas de las fases no eran eficientes y para realizar separaciones complicadas, era necesario recurrir a columnas muy largas, con lo cual el tiempo de análisis era elevado y se consumía mucho disolvente. Se sabía por la Cromatografía de Gases (CG) que la eficiencia podía mejorarse si el tamaño de las partículas del material empleado en la fase estacionaria de la CL era reducido. Fue entonces cuando la Cromatografía Líquida de Alta Resolución o, como comúnmente aparece en la bibliografía, HPLC, (High Performance Liquid Chromatography), se desarrolló gradualmente a finales de 1960. En esa época, se utilizaron materiales más eficaces para ser introducidos como fase estacionaria en las columnas y se produjeron adelantos en la instrumentación.

En este Trabajo, se va a emplear cromatografía líquida en "fase invertida" o

“fase reversa”, por lo que la fase móvil será polar y la estacionaria no polar. Esta última está formada por gel de sílice constituido por pequeñas partículas de sílice porosa, como material de base, que se funden entre sí mediante enlaces puente Si-O-Si (siloxano) para formar una matriz porosa de alta superficie. A ésta se le incorpora químicamente una cadena hidrocarbonada de 18 átomos de carbono C_{18} , denominándose a este proceso “silanización”. Se habla también de fases ligadas de ODS (octadecilsilano). Con estas fases el mecanismo de adsorción no es a veces claro, y muchos de los trabajos teóricos y experimentales que se están llevando a cabo actualmente, intentan clarificar tales mecanismos. En definitiva, la retención de los solutos se puede explicar atendiendo, de manera casi exclusiva, a las interacciones hidrofóbicas soluto-fase estacionaria. Esta interacción se fundamenta en el hecho de que todas las moléculas orgánicas tienen regiones hidrofóbicas en su estructura más o menos amplias, siendo capaces de interactuar con la fase estacionaria, de ahí la universalidad de esta última.

Cuando las partículas empaquetadas en la columna son de pequeño tamaño, presentan una resistencia considerable al paso del disolvente y por eso la fase móvil debe ser impulsada a través de la columna a alta presión. Normalmente, la columna tiene de 10 a 25 cm de largo y 4.6 mm de diámetro interno. Estas columnas se pueden volver a utilizar para un amplio número de muestras.

La naturaleza de la fase móvil es el factor clave para la discriminación entre solutos. En análisis por HPLC la fase móvil es impulsada a través de la columna a un flujo de 1 a 5 mL min⁻¹. Si la composición de la fase móvil es constante, el método se llama elución “isocrática”, pero si esta composición es variada de un modo predeterminado durante la separación, se llama elución en “gradiente”.

Las propiedades básicas que nos interesan de la fase móvil son la fuerza o capacidad de desplazamiento de los solutos y su selectividad. En cromatografía en fase reversa, dado que la retención de los solutos en la fase estacionaria ocurre fundamentalmente a través de las regiones no polares de los solutos, la relación entre fuerza o capacidad de desplazamiento y polaridad de la fase móvil es inversa. Así, el agua es un eluyente con mínimo poder de elución y debe mezclarse con disolventes menos polares para eluir solutos fuertemente retenidos por la fase estacionaria no polar. De forma general, la estrategia a seguir en las separaciones cromatográficas, consiste en:

- Ajustar la fuerza de la fase móvil a un nivel constante, para que la retención de los solutos en la fase estacionaria y su tiempo de permanencia en la columna sea el adecuado, y no alargar excesivamente el tiempo de análisis, evitando la dispersión de los picos.

- Modificar la composición de la fase móvil hasta conseguir la selectividad necesaria para lograr la discriminación requerida entre solutos.

Después de pasar a través de la columna, los analitos separados llegan al detector que proporciona los datos de los compuestos en forma de señal eléctrica. Hasta el momento no hay ningún detector universal para HPLC.

Otro hecho a tener en cuenta, es que no todos los analitos son fácilmente detectables en HPLC, y para conseguir su análisis, a veces, es necesario transformarlos en otras formas detectables después de emerger de la columna. A esta técnica se le denomina "derivatización post-columna" (descrita en la sección I.D) y es lo que en este Trabajo de Investigación se realiza.

PARÁMETROS CROMATOGRÁFICOS

U Tiempo de retención (t_R).- Es el tiempo que tarda el analito en pasar a través del sistema bajo unas determinadas condiciones cromatográficas. La retención puede medirse en tiempos, volúmenes o distancias.

U Factor de capacidad (k).- Aunque un pico puede ser identificado por su tiempo de retención, debido a que éste varía con la longitud de la columna y el valor del flujo de la fase móvil, es mejor identificar los picos usando el factor de capacidad, que se define como:

$$k' = (t_R - t_0) / t_0$$

donde t_0 es el tiempo muerto o tiempo de un soluto no retenido que viaja por la columna a la misma velocidad que la fase móvil y t_R es el tiempo de retención del compuesto considerado. En un sistema multicomponente, se intenta mantener el valor de k' entre 1 y 10, ya que si los valores de k' son demasiado bajos es probable que los solutos no se puedan resolver adecuadamente, y para valores altos de k' , el tiempo de análisis sería demasiado alto.

U Resolución (R_s).- El grado de separación de un componente con respecto a otro viene dado por la resolución, medida como la diferencia en los tiempos de retención de dos solutos dividido por la semisuma de las anchuras en la base (w_b) de cada uno de ellos:

$$R_s = (t_{R2} - t_{R1}) / [(w_{b1} + w_{b2}) / 2]$$

En una separación, considerada satisfactoria, es aceptado un valor de R_s de 1, correspondiente a una separación entre picos del orden del 94 %, aunque para que exista una resolución prácticamente total, resolución a línea base, debe ser igual o superior a 1.5.

U Número de platos (N) o altura de plato (H).- Ambos parámetros se utilizan para medir la eficacia de una columna, siendo N adimensional y teniendo H unidades de longitud.

$$N = 16 (t_R / w_b)^2$$

$$H = L / N$$

Con objeto de elegir el caudal más apropiado se estudiará la influencia de éste en el ancho de pico y en el número de platos teóricos, o lo que es lo mismo, en la eficacia del sistema cromatográfico. Un plato teórico es un sistema microscópico de columna donde existe un perfecto equilibrio del soluto entre las fase móvil y estacionaria. De las dos medidas, la altura de platos es generalmente preferida puesto que mide la eficacia por unidad de longitud de columna y es más útil a la hora de efectuar comparaciones.

Generalmente, la eficacia de una columna en HPLC aumenta a medida que disminuye el tamaño de las partículas dentro de la columna. Así, Las columnas comerciales de fase reversa de sílica ligada tienen alrededor de 50.000 platos m^{-1} con partículas de 5 : m y la mitad de platos para partículas de 10 : m. El número de platos necesario depende del tipo de trabajo a realizar; muchos análisis de rutina en HPLC son suficientemente eficaces aún cuando el número de platos teóricos es bastante más bajo que los citados anteriormente.

Cuando se desarrolla un método en HPLC se busca una separación adecuada entre los componentes de la mezcla, en un tiempo aceptable. Para conseguir esto, se opera variando la columna, la temperatura, el caudal, pero el factor decisivo que controla la separación de los compuestos, es la composición de la fase móvil, es decir,

encontrar la composición adecuada para que la separación tenga lugar en el menor tiempo.

Queremos señalar que en todas las experiencias realizadas se ha tomado como señal analítica la altura de pico, que nosotros designamos como h_p y el área de pico, A_p .

Observaciones

Las condiciones en las que se obtenían las máximas señales para la detección de los compuestos en estudio, habían sido previamente estudiadas por fluorescencia, pero al emplear estas mismas condiciones en HPLC, nos encontramos con una serie de problemas:

U El empleo de 2-PrOH:agua como fase móvil, en distintas proporciones, para separar la mezcla de las 4 fenilureas, suponía realizar los cromatogramas en tiempos superiores a 50 minutos. La ventaja que presenta es que se consiguen separar I soproturón y Diurón. Sin embargo, otro inconveniente que teníamos era que los tiempos de retención no se mantenían constantes, sino que a medida que introducíamos los analitos en el cromatógrafo, parte de los fotoproductos formados se iban quedando retenidos en la columna, de modo que cada vez los tiempos de retención eran más pequeños. A ello había que sumar que el pico de Neburón (el último de los compuestos que se eluye) tenía una forma bastante deformada, con colas.

U Se sustituyó este disolvente por acetonitrilo, pero hubo que volver a buscar los máximos de excitación y emisión de cada uno de los compuestos en esas nuevas condiciones. De todos modos, se conseguía separar una mezcla de 3 compuestos en menos de 15 minutos. Los picos correspondientes a Diurón e

I soproturón aparecían al mismo tiempo, por eso hubo que establecer un método alternativo para la separación de ambas especies.

U Propanil sí que es posible detectarlo en las condiciones de las fenilureas, ya que aparece entre los picos correspondientes a I soproturón o Diurón y Linurón. Cuando se inyecta una mezcla en la que estén presentes los fenoxiácidos, éstos aparecen con el frente y no es posible determinarlos

IV.1.A.2.- Elección de la fase móvil

Como ya se ha indicado, la naturaleza de la fase móvil es el factor decisivo para la separación entre solutos en HPLC, como ocurre con la temperatura en la cromatografía gaseosa.

La selectividad se basa en las interacciones específicas entre el soluto y la fase móvil. Por tanto, las propiedades que interesan de la fase móvil son su capacidad desplazante y su selectividad.

En los estudios llevados a cabo empleando fluorescencia fotoinducida se comprobó que 2-PrOH y sus mezclas con agua eran los disolventes en los que se obtenía la máxima señal PI F. En la técnica que ahora nos ocupa, la señal PI F no es el factor decisivo a considerar sino que además, debe tenerse en cuenta el tiempo empleado en la separación de los compuestos, la resolución entre ellos y la anchura de los picos cromatográficos, Así se prueban otros disolventes, además del 2-PrOH, para ser utilizados como fases móviles, tales como metanol:agua y acetonitrilo:agua, en distintas proporciones, con el fin de optimizar todos los parámetros.

Las disoluciones empleadas como fase móvil se filtran a través de filtros de 45 μ m de diámetro de poro, así como los volúmenes de muestra inyectados en la válvula de inyección, equipada con un bucle de 20 μ L. Por otra parte, la fase móvil es desgasificada en un baño de ultrasonido.

Dado que se desconocen cuales son las longitudes de onda de excitación y emisión de estos compuestos, en las fases móviles que se van a emplear, se decide utilizar el detector fotométrico, en lugar del de fluorescencia.

En la Tabla IV.1.A.1 se resumen los tiempos de retención para cada una de las fenilureas en función de la composición de la fase móvil, empleando un caudal de 1.0 mL/min y empleando el detector fotométrico.

Tabla IV.1.A.1. - Tiempos de retención, en minutos, correspondientes a cada una de las fenilureas con fase móvil compuesta por ACN:H₂O, v/v, en distintas proporciones.

Compuesto	ACN:H ₂ O (70:30)	ACN:H ₂ O (60:40)	ACN:H ₂ O (50:50)	ACN:H ₂ O (40:60)	ACN:H ₂ O (35:65)	ACN:H ₂ O (30:70)	ACN:H ₂ O (25:75)
I soproturón	1,55	1,70	2,50	4,40	5,46	11,25	20,6
Diurón	1,55	1,70	2,50	4,60	5,76	11,82	21,9
Linurón	1,95	2,40	4,19	9,70	13,0	30,83	-
Neburón	2,60	3,50	7,63	23,5	32,8	>45,0	-

Se aprecia que a medida que disminuye el contenido de fase orgánica, los tiempos de retención aumentan hasta llegar al extremo de no incluir Linurón y Neburón en la mezcla, por emplear demasiado tiempo en la obtención del

cromatograma.

A partir de la mezcla ACN:H₂O (50:50), v/v se observa un desdoblamiento de lo que antes era un solo pico, I soproturón + Diurón, en dos, muy poco resueltos. Se varió la composición de la fase móvil con objeto de conseguir la separación de éstos, pero no fue posible, ya que no se consigue que R_S > 1.

Por este motivo, se decide ensayar con otra fase móvil, compuesta por MeOH:H₂O, en distintas proporciones. En la Tabla IV.1.A.2 se recogen los tiempos de retención encontrados en estas condiciones, con un caudal de 1.0 mL/min.

Tabla IV.1.A.2.- Tiempos de retención, en minutos, de las fenilureas en estudio en distintas proporciones de MEOH:H₂O.

Compuesto	MEOH:H ₂ O (60:40), v/v	MEOH:H ₂ O (40:60), v/v
Isoproturón	2,96	21,67
Diurón	3,14	23,36
Linurón	4,12	-
Neburón	8,93	-

Se comprueba que con MeOH:H₂O (60:40), v/v, la resolución de los dos primeros picos es bastante pequeña. Empleando MeOH:H₂O (40:60), v/v, existe un mayor resolución entre los picos correspondientes a I soproturón y Diurón pero, por contra, los tiempos de retención aumentan bastante. Dado que no se consigue una

resolución aceptable (R\$1), se decide ensayar la fase móvil 2-PrOH:H₂O, en distintas proporciones.

En la Tabla IV.1.A.3 se muestran los tiempos de retención que presentan cada uno de los compuestos en las fases móviles empleadas.

Tabla IV.1.A.3.- Tiempos de retención, en minutos, de las fenilureas en distintas proporciones de la fase móvil 2-PrOH:H₂O. El caudal de trabajo fue 1.0 mL/min.

Compuesto	2-PrOH:H ₂ O (30:70), v/v	2-PrOH:H ₂ O (25:75), v/v
Isoproturón	5,3	10,5
Diurón	6,1	13,7
Linurón	8,7	21,2
Neburón	27,3	-

Con la fase móvil 2-PrOH:H₂O (30:70), v/v, la resolución de I N y DN no llega a ser completa por lo que se ensayó, la proporción 2-prOH:H₂O (25:75), v/v. En estas condiciones, se resuelven los picos citados, aunque aumentan, considerablemente, los tiempos de retención, siendo necesario para NN un tiempo de elución del orden de 1

hora.

Cuando se empleó como fase móvil 2-PrOH:tampón fosfato (25:75), v/v, pH 7, C = 0.01 M, como se muestra en la Figura IV.1.A.1, se consigue la separación de I N, DN y LN, pero se observa una importante falta de reproducibilidad en los tiempos de retención. Este hecho pensamos que es debido a que la fase móvil empleada no tiene el suficiente poder de elución y hace que se queden especies retenidas en la columna; de esa forma las fenilureas cada vez quedan menos tiempo retenidas a medida que van pasando muestras a través de la columna.

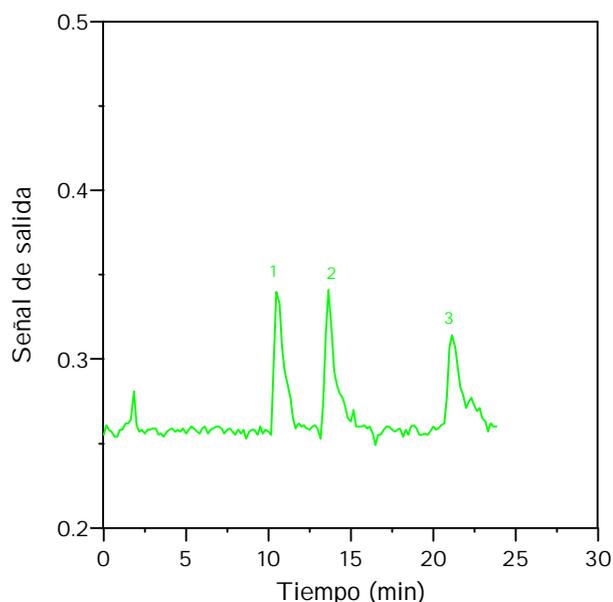


Figura IV.1.A.1. - Cromatograma correspondiente a la separación de 1) I N, 2) DN y 3) LN, empleando como fase móvil 2-PrOH:tampón fosfato (25:75), v/v, pH 7, C = 0.01 M.

Caudal = 1.0 mL/min, [Herbicida] = 8.0 : g mL⁻¹. $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ = 285/360 nm

A la vista de los resultados obtenidos, en los diferentes ensayos descritos, se optó por emplear como fase móvil ACN:tampón (60:40), aunque no resuelva los picos

correspondientes a DN e LN.

MEZCLA COMPUESTA POR DN-LN-NN

IV.1.A.3.- Condiciones de trabajo

Estudios anteriores, llevados a cabo empleando fluorescencia clásica, nos permitieron conocer las longitudes de onda de estos herbicidas en ACN:H₂O (60:40), v/v. Éstas serán las que se empleen a continuación hasta optimizar todas las variables, para buscar entonces sus longitudes de onda óptimas en ese nuevo medio. A continuación, se indican las mencionadas longitudes de onda:

$$\text{Diurón} \quad \lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{em}} = 316 / 406 \text{ nm}$$

$$\text{I soproturón} \quad \lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{em}} = 305 / 434 \text{ nm}$$

$$\text{Linurón} \quad \lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{em}} = 322 / 400 \text{ nm}$$

$$\text{Neburón} \quad \lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{em}} = 322 / 390 \text{ nm}$$

La fase móvil a emplear será la constituida por ACN:tampón fosfato pH 7 y C=0.01 M. Se decide usar un tampón de pH en lugar de agua, de cara a futuras aplicaciones que requieran un control de esta variable. Previamente, se prueban distintas proporciones acetonitrilo:tampón con el fin de obtener cromatogramas cuyos picos sean lo más sensibles posibles, empleando el menor tiempo. En este sentido se comprobó que las dos proporciones más adecuadas de ser empleadas eran (50:50), v/v, y (60:40), v/v.

En la Figura IV.1.A.2 se muestra el cromatograma correspondientes a la separación de DN-LN-NN, empleando como fase móvil ACN:tampón fosfato pH 7, C=0.01 M, en las proporciones citadas. Se observa que la proporción (60:40), v/v

consigue separar las tres fenilureas en menor tiempo y los picos obtenidos están mejor definidos. De ahí que la fase móvil elegida, para experiencias posteriores, sea ACN:tampón fosfato (60:40), v/v, pH 7 y C= 0.01 M.

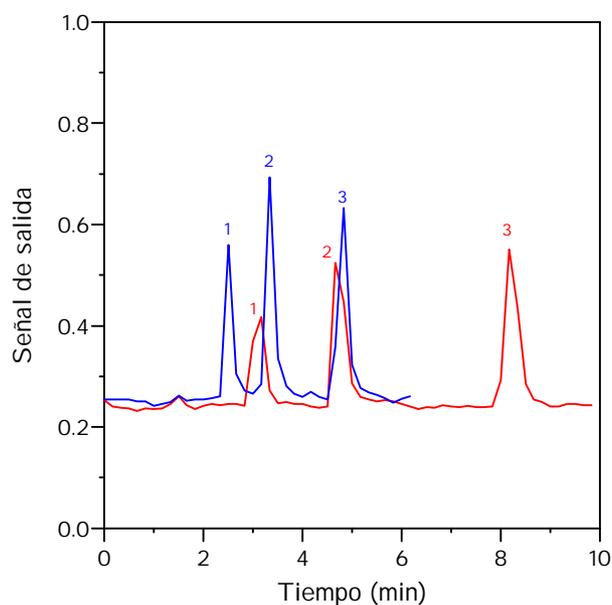


Figura IV.1.A.2. - Cromatograma correspondiente a la separación de 1) DN, 2) LN y 3) NN empleando un caudal = 1.0 mL/min. (—) ACN:tampón fosfato (50:50), v/v, pH 7 y C= 0.01 M, (—) ACN:tampón fosfato (60:40), v/v, pH 7 y C= 0.01 M.

$$[\text{DN}] = [\text{LN}] = 4.0 : \text{g mL}^{-1}, [\text{NN}] = 8.0 : \text{g mL}^{-1}. \frac{8_{\text{exc}}}{8_{\text{em}}} = 320/400 \text{ nm.}$$

IV.1.A.4. - Elección del caudal

El caudal es uno de los parámetros a optimizar en el sistema cromatográfico, para ello lo hicimos variar entre 0.4 y 0.7 mL/min, encontrando que a medida que aumenta el caudal, el cromatograma se obtiene en menor tiempo. Por contra, la resolución de los picos es menor, aunque nunca llega a ser menor de 1. Otro aspecto a considerar es que el bolo de muestra debe permanecer un determinado tiempo en el fotorreactor para ser irradiado y se originen los fotoproductos fluorescentes; por eso, un caudal pequeño hará que la señal sea mayor. Debemos llegar a una condición de compromiso para la obtención de la mayor señal, empleando un tiempo razonable.

En la Tabla IV.1.A.5 se muestran los tiempos de retención, así como las alturas y áreas de pico de cada uno de los herbicidas a los distintos caudales ensayados, obtenidos como media aritmética de tres réplicas.

Tabla IV.1.A.5. - Influencia del caudal en la altura y área de pico y tiempos de retención de cada una de las fenilureas.

Caudal (mL/min)	Diurón			Linurón			Neburón		
	t_R^a	h_p^b	A_p^c	t_R^a	h_p^b	A_p^c	t_R^a	h_p^b	A_p^c
0,4	6,12	338	7,7	8,10	394	9,6	11,60	189	7,8
0,5	4,85	283	6,1	6,40	335	6,3	9,09	158	3,3
0,6	4,02	232	3,6	5,32	278	4,7	7,56	137	2,4
0,7	3,44	202	2,6	4,55	260	3,6	6,47	105	1,6

^{a)} t_R : tiempo de retención (min)

^{b)} h_p : altura de pico (mV)

^{c)} A_p : Área de pico (V/s)

Como ya se comentó anteriormente, para elegir el caudal más apropiado, también haremos uso del estudio de la influencia de éste en el número de platos teóricos (N).

En la Tabla IV.1.A.6 se representan los valores de N de cada compuesto en función del caudal empleado.

Tabla IV.1.A.6. - Influencia del caudal en el número de platos teóricos.

Caudal (mL/min)	N (DN)	N (LN)	N (NN)
0,4	662	833	2116
0,5	508	809	2070
0,6	368	690	1430
0,7	509	716	1693

En la Figura IV.1.A.3 se representa la altura de pico y el área en función del caudal, para los tres herbicidas estudiados.

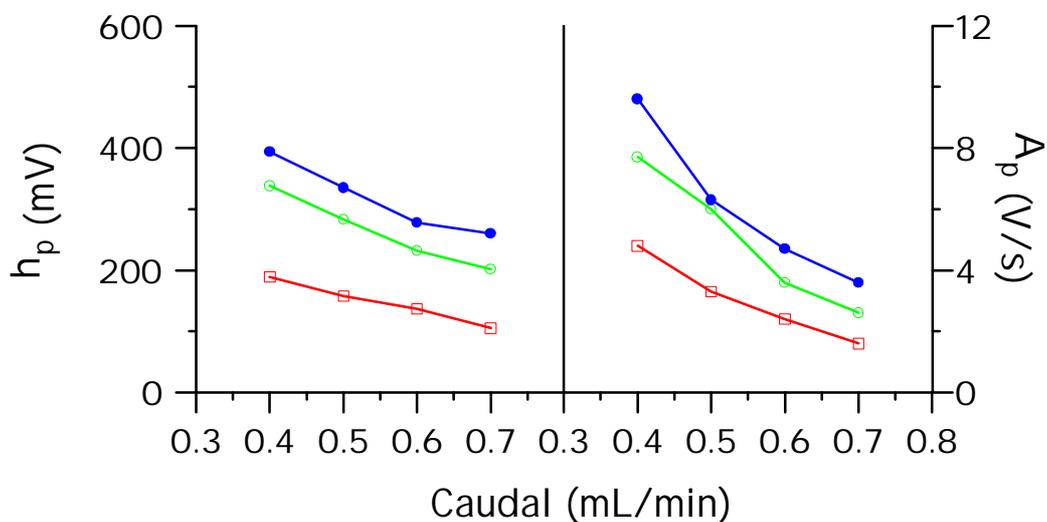


Figura IV.1.A.3.- Influencia del caudal en la altura y el área del pico del DN ("), LN (!) y NN (G).

A la vista de los tiempos de retención y del número de platos teóricos obtenidos para cada herbicida, elegimos un caudal de 0.4 mL/min como óptimo para llevar a cabo experiencias posteriores, por ser el que proporciona mayores valores de N, así como de alturas y áreas de pico.

IV.1.A.5.- Influencia del pH y la concentración de disolución tampón

Es fundamental fijar el pH de trabajo, con vistas a posibles aplicaciones a muestras reales. Los trabajos encontrados en bibliografía, así como los llevados a cabo por nosotros, pusieron de manifiesto que los mejores resultados se obtenían cuando se trabajaba a pH próximos al que daban los compuestos en el disolvente empleado, en este caso, entre 6 y 8.

Se preparan disoluciones tampón de pH comprendidos entre 6.5 y 8.0 con tampón fosfato 0.01 M y modificando el pH con KOH. Estas disoluciones, así como las de los herbicidas, todos ellos 1.6 g mL^{-1} , se emplean recién preparadas.

A pH 6.5 y 7.0 se obtienen picos bien definidos, mientras que a pH 7.5 y 8.0 empiezan a aparecer colas que dificultan la medida del área y altura de éstos. Los resultados obtenidos a pH 6.5 y 7.0 son muy similares en lo que a DN y LN se refiere, pero con NN, se mejora a pH 7.0.

Se elige como pH óptimo el de 7 y a continuación, se optimiza la concentración de tampón. Para ello, se preparan disoluciones de tampón fosfato de concentraciones 0.02, 0.01, 0.005 y 0.002 M, ajustando el pH con KOH y se estudia cómo influye la concentración del mismo en la altura y el área de pico de cada uno de los herbicidas. La concentración es de 1.6 g mL^{-1} y se inyecta por triplicado.

En la Figura IV.1.A.4 se muestra la influencia de la concentración de la disolución tampón en la altura y área de pico de cada uno de los herbicidas.

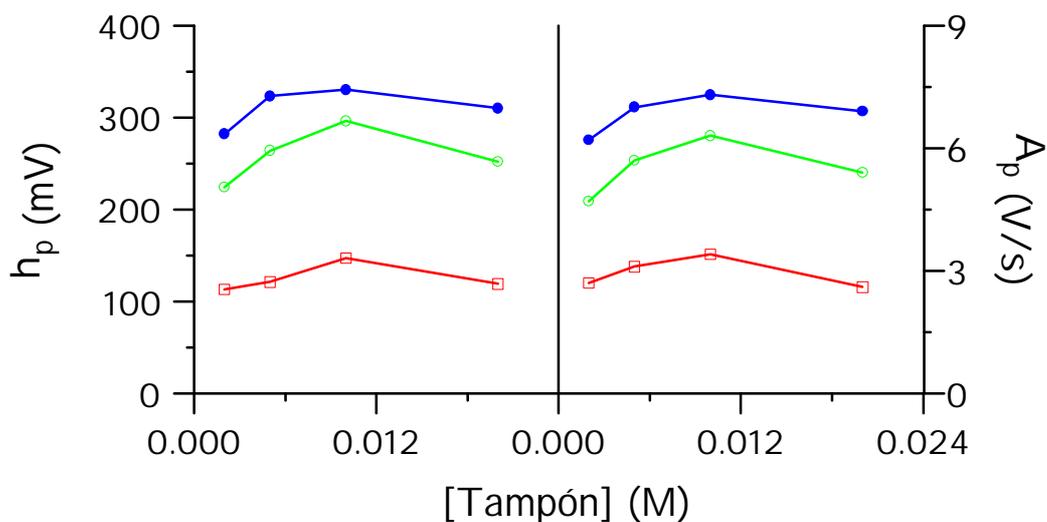


Figura IV.1.A.4.- Influencia de la concentración del tampón en la señal cromatográfica. (") DN (!) LN y (G) NN.

A la vista de las gráficas, se decide tomar la concentración de disolución tampón 0.01 M como la concentración óptima, para llevar a cabo las próximas experiencias, puesto que se obtienen mejores señales que con las otras concentraciones.

IV.1.A.6.- Espectros de excitación y emisión

Una vez fijadas las variables óptimas para el establecimiento de las rectas de calibrado, se procede a la búsqueda de las longitudes de onda de excitación y emisión, en estas condiciones, empleando los parámetros instrumentales:

- S = 800 V
- Rendijas de excitación y emisión = 4 nm
- $t_{irr} = 15$ minutos
- $C_{herbicida} = 0.8 : g mL^{-1}$

En la Tabla IV.1.A.7 se resumen las longitudes de onda de excitación y emisión encontradas para cada compuesto.

Tabla IV.1.A.7.- Longitudes de onda de excitación y emisión de las fenilureas. Fase móvil ACN:tampón fosfato pH 7 y C = 0.01 M (60:40), v/v.

COMPUESTO	$\lambda_{exc} / \lambda_{em}$ (nm)
Diurón	324 / 403
Linurón	335 / 411
Neburón	326 / 385

En la Figura IV.1.A.5 se muestran los espectros de excitación y emisión.

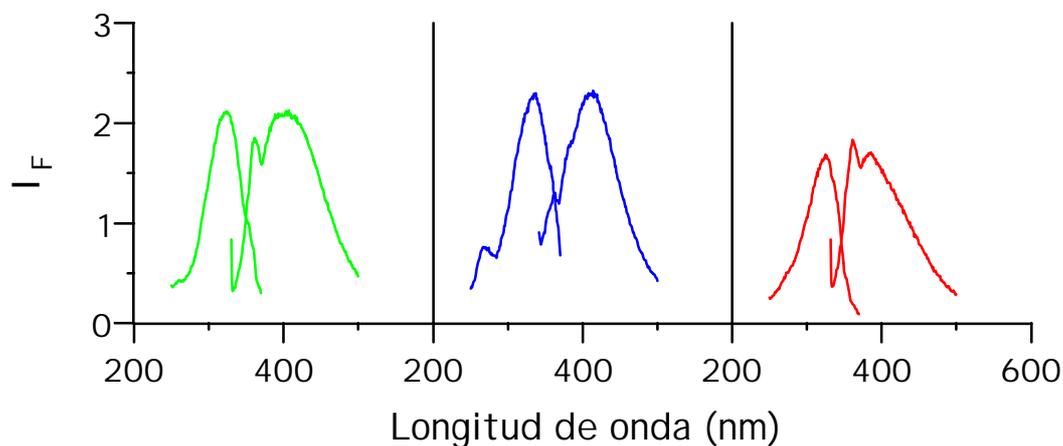


Figura IV.1.A.5. - Espectros de excitación y emisión de DN, LN y NN.

IV.1.A.7. - Rectas de calibrado.

Una vez fijadas las condiciones de trabajo, se procede al establecimiento de las rectas de calibrado. Se prepara la fase móvil constituida por ACN: tampón fosfato pH 7, C=0.01 M (60:40), v/v, y las disoluciones madre de DN, LN y NN de 400 : g mL⁻¹, en ACN. A continuación, se prepara una única disolución que contiene DN y LN en una concentración de 100 : g mL⁻¹ y NN en concentración de 150 : g mL⁻¹, de la que se toman distintas alícuotas para establecer la recta de calibrado.

Se preparan tres disoluciones diferentes para una misma concentración y cada una de estas disoluciones es asimismo inyectada por triplicado. El espectrofluorímetro se programa para que cada uno de los herbicidas sea detectado a su longitud de onda óptima. En los cromatogramas obtenidos, una vez medida la altura y el área de cada pico, se establecen, mediante el método de mínimos

cuadrados, los modelos lineales para cada herbicida en el intervalo de concentraciones estudiado. En la Tabla IV.1.A.8 se recogen los tiempos de retención (t_R) de cada compuesto, factores de capacidad (K'), resolución entre los picos (R), así como el intervalo de concentraciones en el que se aplica el método.

Tabla IV.1.A.8.- T_R , K' , R e intervalo de concentraciones obtenidos para cada compuesto.

Compuesto	t_R (min)	K'	R	Intervalo de concentración (\pm g mL ⁻¹)
Diurón	5,7	0,5	-	0,6 - 3,6
Linurón	7,6	0,9	1,5	0,6 - 3,6
Neburón	10,5	1,6	2,3	0,9 - 4,8

Aunque anteriormente se haya dicho que los valores del factor de capacidad deben ser inferiores a 10, para no tener tiempos de análisis excesivamente altos y superiores a 1, para que los solutos puedan ser resueltos adecuadamente, diferenciándolos del frente, para K' de 0.5, sin embargo, obtenemos un K' es posible su resolución puesto que la señal dada por el frente no interfiere, tal y como se observa en la Figura IV.1.A.6.

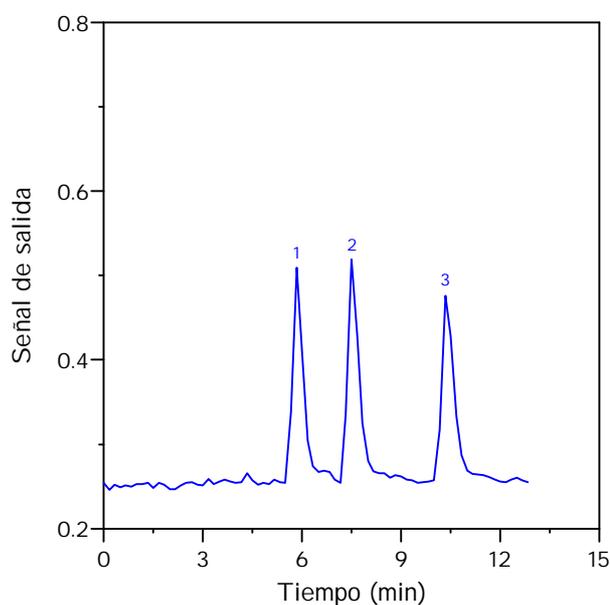
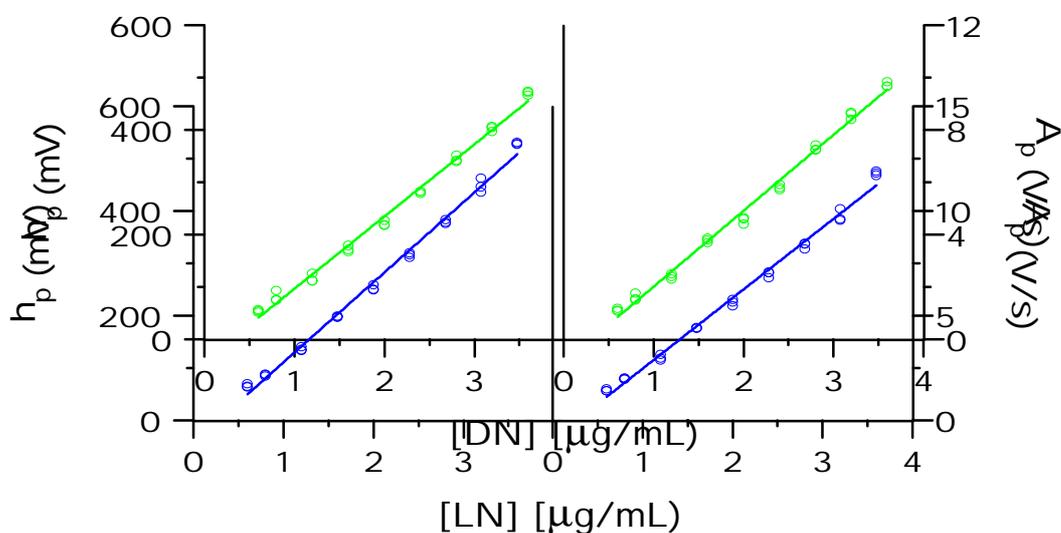


Figura IV.1.A.6. - Cromatograma correspondiente a la separación de 1) DN, 2) LN y 3) NN. Caudal = 0.4 mL/min. [DN] = [LN] = 2.0 : g mL⁻¹, [NN] = 3.0 : g mL⁻¹. ACN:tampón fosfato (60:40), v/v, pH 7 y C= 0.01 M.

IV.1.A.7.1. - Ecuación de la recta de calibrado y parámetros estadísticos

Los resultados obtenidos se representan en la Figura IV.1.A.7 ,mientras que los parámetros estadísticos que se derivan del análisis de las rectas obtenidas se recogen en las Tablas IV.1.A.9-11. También se recogen los valores de desviación estándar relativa encontrados al examinar la repetitividad del método cromatográfico con una serie de 11 muestras iguales, cuya concentración para cada analito se especifica en la Tablas.



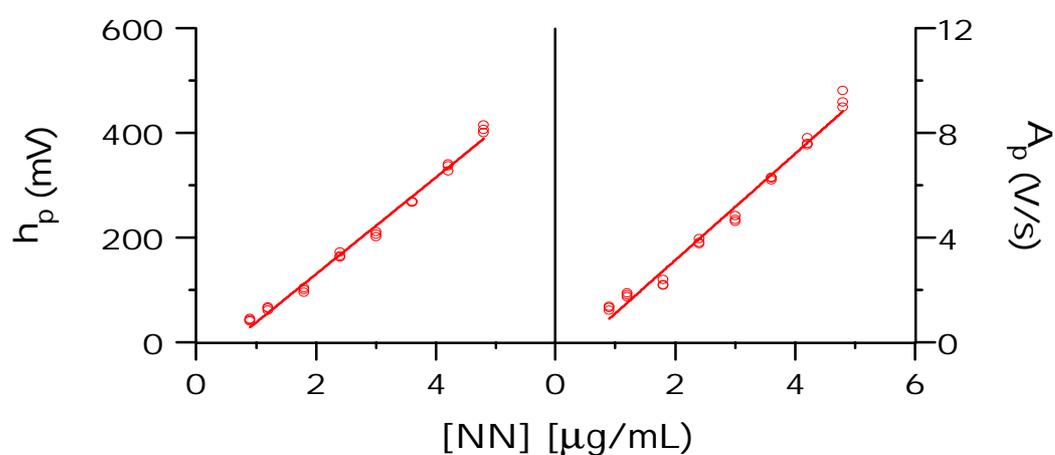


Figura IV.1.A.7.- Rectas de calibrado.

Tabla IV.1.A.9.- Parámetros estadísticos obtenidos para **Diurón**.

	Altura de pico (mV)	Área de pico (V/s)
Ecuación de la recta	$H = 137,77C - 40,49$	$A = 2,90C - 0,88$
$F_{\text{pendiente}}$	2,22	0,05
F_{ordenada}	5,01	0,10
$F_{\text{regresión}}$	11,54	0,24
r^2	0,994	0,994
DER (%) ($1.6 : g mL^{-1}$)	1,74	1,71

Tabla IV.1.A.10.- Parámetros estadísticos obtenidos para **Linurón**.

	Altura de pico (mV)	Área de pico (V/s)
Ecuación de la recta	H = 152,75 C - 41,05	A = 3,37 C - 0,88
F _{pendiente}	2,33	0,05
F _{ordenada}	5,25	0,13
F _{regresión}	12,10	0,30
r ²	0,994	0,993
DER (%) (1.6 : g mL ⁻¹)	1,61	1,84

Tabla IV.1.A.11.- Parámetros estadísticos obtenidos para **Neburón**.

	Altura de pico (mV)	Área de pico (V/s)
Ecuación de la recta	H = 92,32 C - 53,92	A = 2,03 C - 0,92
F _{pendiente}	1,20	0,06
F _{ordenada}	6,06	0,17
F _{regresión}	12,90	0,37
r ²	0,990	0,983
DER (%) (2.4 : g mL ⁻¹)	2,02	2,40

IV.1.A.10.2.- Parámetros de fiabilidad. Repetitividad

En las Tablas IV.1.A.12-14 se recogen los parámetros de fiabilidad obtenidos para cada uno de los herbicidas estudiados. El límite de determinación se ha calculado como se definió, anteriormente, cuando no se dispone de la señal del blanco.

Tabla IV.1.A.12.- Parámetros de fiabilidad para **Diurón**.

	h_p (mV)	A_p (v/s)
Linealidad (1-DER (b)) %	98,4	98,4
Sensibilidad analítica (: g mL^{-1})	0,08	0,08
Límite de determinación (: g mL^{-1})	0,60	0,59
LD, Winefordner y Long (: g mL^{-1})	0,11	0,11
LD, Clayton (: g mL^{-1})	0,20	0,20

Tabla IV.1.A.13.- Parámetros de fiabilidad para [Linurón](#).

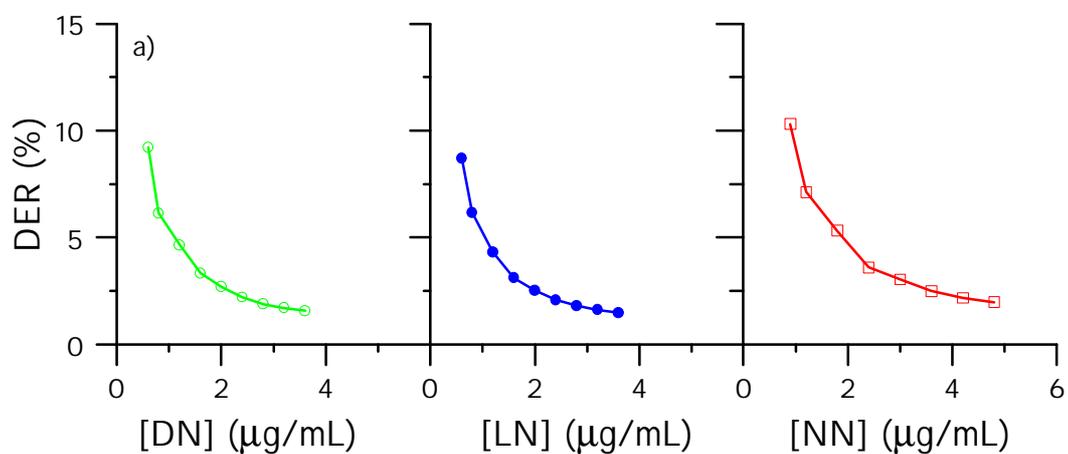
	h_p (mV)	A_p (V/s)
Linealidad (1-DER (b)) %	98,5	98,3
Sensibilidad analítica (: g mL^{-1})	0,08	0,09
Límite de determinación (: g mL^{-1})	0,57	0,65
LD, Winefordner y Long (: g mL^{-1})	0,10	0,12
LD, Clayton (: g mL^{-1})	0,19	0,22

Tabla IV.1.A.14.- Parámetros de fiabilidad para [Neburón](#).

	h_p (mV)	A_p (V/s)
Linealidad (1-DER (b)) %	97,8	97,2
Sensibilidad analítica (: g mL^{-1})	0,14	0,18
Límite de determinación (: g mL^{-1})	1,04	1,36

	h_p (mV)	A_p (V/s)
LD, Winefordner y Long (: g mL^{-1})	0,20	0,26
LD, Clayton (: g mL^{-1})	0,35	0,46

En la Figura VI.2.A.8 se representan las desviaciones estándar para cada concentración y para cada uno de los herbicidas, en función del área y la altura de pico.



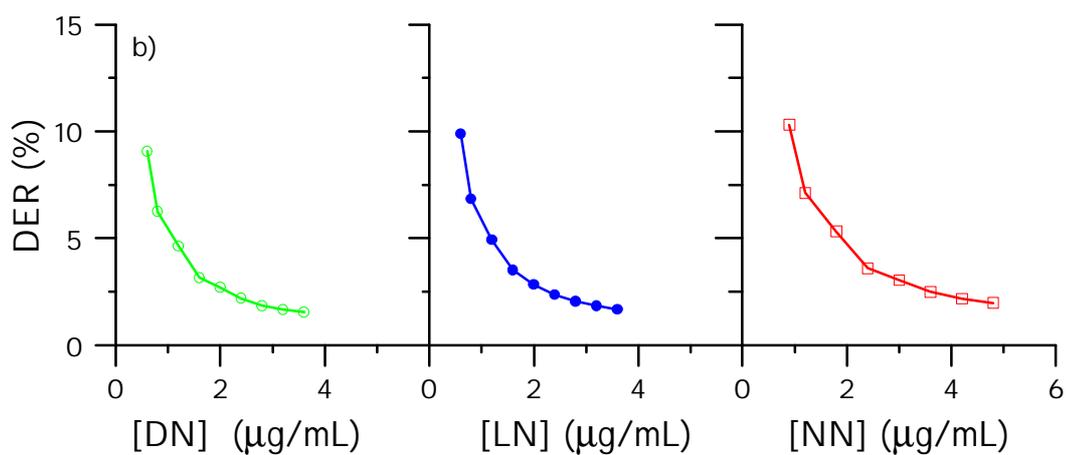


Figura IV.1.A.8. - Desviación estándar relativa de los herbicidas.

- a) En función de la altura de pico
- b) En función del área de pico

MEZCLA COMPUESTA POR IN-LN-NN

En este estudio, se realizaron las experiencias necesarias para poner a punto un método sustituyendo DN por IN, sabiendo que la fase móvil más adecuada es la constituida por ACN:tampón fosfato de pH 7, C = 0.01 M (60:40), v/v.

IV.1.A.8. - Influencia del caudal

Para estudiar esta influencia, se procede de igual modo al seguido con la mezcla DN-LN-NN, variando el caudal entre 0.4 y 0.7 mL/min.

Volvió a ponerse de manifiesto que el caudal que mayores señales de pico y de área conseguía era el de 0.4 mL/min, que fue el que se empleó para establecer las correspondientes rectas de calibrado, como se observa en la Figura IV.1.A.9

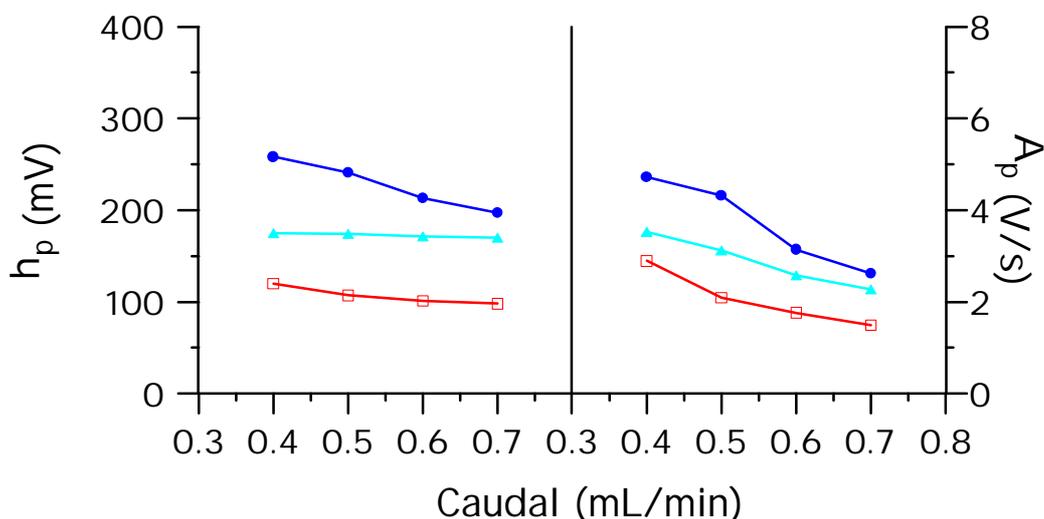


Figura IV.1.A.9. - Influencia del caudal en la altura y el área del pico.

IN (•), LN (!) y NN (G).

IV.1.A.9. - Espectros de excitación y emisión

Para encontrar las longitudes de onda del IN, procedemos del mismo modo que lo hicimos con los otros herbicidas. En la Figura IV.1.A.10, se muestran los espectros de excitación y emisión encontrados con las condiciones instrumentales:

○ $S = 800 \text{ V}$

○ Rendijas de excitación y emisión = 4 nm

○ $t_{\text{irr}} = 15 \text{ min}$

○ $C_{\text{herbicida}} = 0.8 : \text{g mL}^{-1}$

Las longitudes de onda de excitación y emisión obtenidas son de 301 y 433 nm, respectivamente.

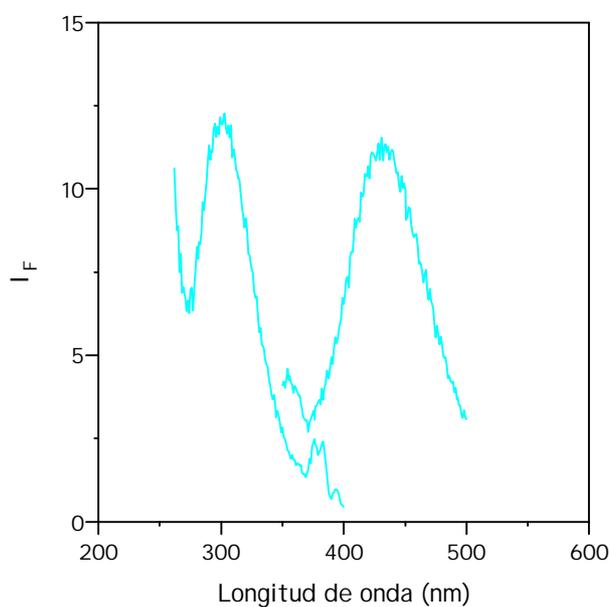


Figura IV.1.A.10. - Espectros de excitación y emisión de **IN** en ACN:tampón fosfato pH 7 y $C = 0.01 \text{ M}$ (60:40), v/v.

IV.1.A.10. - Rectas de calibrado

Una vez seleccionadas las condiciones de trabajo se procede al establecimiento de las rectas de calibrado. Se prepara la fase móvil constituida por ACN:tampón fosfato pH 7, C = 0.01 M (60:40), v/v, y disoluciones madre de I N, LN y NN de 400 : g mL⁻¹, en ACN. A continuación, se prepara una única disolución de 60, 100 y 150 : g mL⁻¹ en I N, LN y NN, respectivamente. De ella se toman distintas alícuotas para establecer las rectas de calibrado. Cada una de las muestras se prepara e inyecta por triplicado. El espectrofluorímetro se programa para que cada uno de los herbicidas sea detectado a su longitud de onda óptima.

En la Tabla IV.1.A.15 se recogen los tiempos de retención (t_R) de cada compuesto, factores de capacidad (K'), resolución entre los picos (R), así como el intervalo de concentraciones en el que se aplica el método.

Tabla IV.1.A.15. - T_R , K' , R e intervalo de concentraciones obtenidos para la mezcla ternaria.

Compuesto	t_R (min)	K'	R	Intervalo de concentración (: g mL ⁻¹)
I soproturón	5,9	0,5	-	0,4 - 2,0
Linurón	7,9	1,0	1,8	0,8 - 3,6
Neburón	11,2	1,8	2,4	1,2 - 4,2

En la Figura IV.1.A.11 se representa el cromatograma obtenido en la separación de la mezcla compuesta por I N-LN-NN.

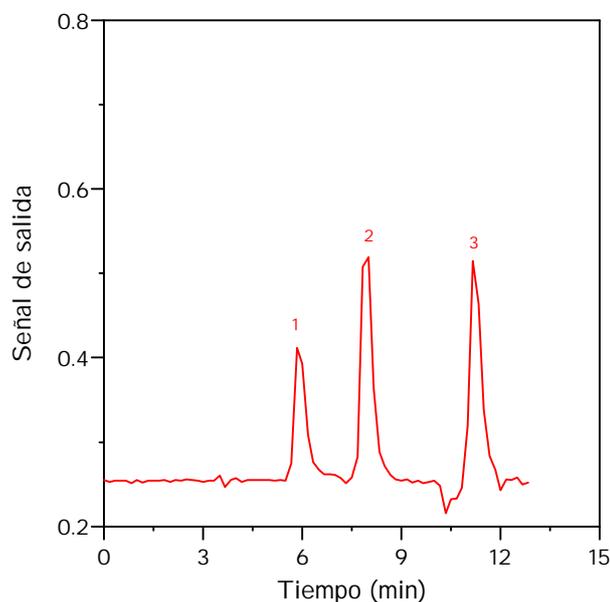


Figura IV.1.A.11. - Cromatograma correspondiente a la separación de 1) I N, 2) LN y 3) NN. Caudal = 0.4 mL/min. Fase móvil ACN:tampón fosfato (60:40), v/v, pH 7, C= 0.01 M. [I N] = 1.0 : g mL⁻¹, [LN] = 2.0 : g mL⁻¹, [NN]=3.0 : g mL⁻¹.

IV.1.A.10.1.- Ecuación de la recta de calibrado y parámetros estadísticos

En las condiciones fijadas se establecen las rectas de calibrado cuyos resultados se representan en la Figura IV.1.A.12.

Por otra parte, los parámetros estadísticos que se derivan del análisis de las rectas obtenidas se recogen en las Tablas IV.1.A.16-18. También se recogen los valores de desviaciones estándar relativas, encontrados al examinar la repetitividad del método cromatográfico con una serie de 11 muestras iguales, cuya concentración para cada analito se especifica en las Tablas.

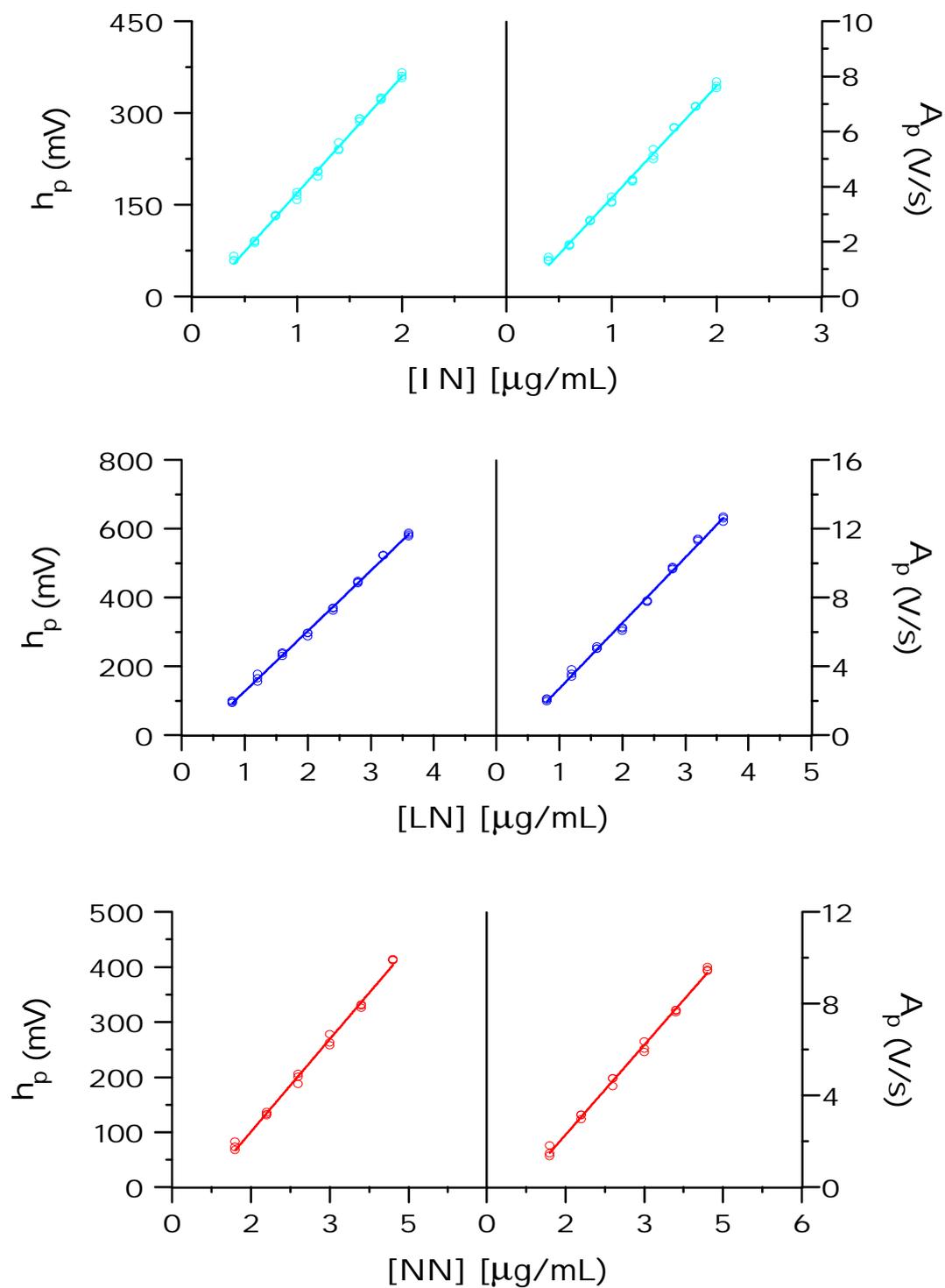


Figura IV.1.A.12.- Rectas de calibrado.

Tabla IV.1.A.16.- Parámetros estadísticos obtenidos para [Isoproturón](#).

	Altura de pico (mV)	Área de pico (V/s)
Ecuación de la recta	$H = 191,2 C - 22,17$	$A = 4,07 C - 0,49$
F _{pendiente}	2,07	0,05
F _{ordenada}	2,71	0,07
F _{regresión}	5,56	0,14
r ²	0,997	0,996
DER (%) (1.5 : g mL⁻¹)	1,10	1,21

Tabla IV.1.A.17.- Parámetros estadísticos obtenidos para [Linurón](#).

	Altura de pico (mV)	Área de pico (V/s)
Ecuación de la recta	$H = 175,3 C - 47,47$	$A = 3,808 C - 1,093$
F _{pendiente}	1,70	0,05
F _{ordenada}	4,04	0,12
F _{regresión}	7,62	0,23
r ²	0,998	0,996
DER (%) (2.0 : g mL⁻¹)	1,32	1,41

Tabla IV.1.A.18.- Parámetros estadísticos obtenidos para **Neburón**.

	Altura de pico (mV)	Área de pico (V/s)
Ecuación de la recta	H = 111,9 C - 66,70	A = 2,61 C - 1,64
F _{pendiente}	2,05	0,04
F _{ordenada}	5,93	0,12
F _{regresión}	8,93	0,17
r ²	0,995	0,996
DER (%) (2.0 : g mL ⁻¹)	1,82	1,62

IV.1.A.10.2.- Parámetros de fiabilidad. Repetitividad

En las Tablas IV.1.A.19-21 se recogen los parámetros de fiabilidad obtenidos para cada uno de los herbicidas estudiados.

Tabla IV.1.A.19.- Parámetros de fiabilidad para **Isopturón**.

	h _p (mV)	A _p (V/s)
Linealidad (1-DER (b)) %	99,0	98,7
Sensibilidad analítica (: g mL ⁻¹)	0,03	0,03
Límite de determinación (: g mL ⁻¹)	0,22	0,26
LD, Winefordner y Long (: g mL ⁻¹)	0,04	0,07
LD, Clayton (: g mL ⁻¹)	0,07	0,09

Tabla IV.1.A.20.- Parámetros de fiabilidad para **Linurón**.

Parámetros de fiabilidad	h_p (mV)	A_p (V/s)
Linealidad (1-DER (b)) %	99,0	98,6
Sensibilidad analítica (\pm g mL ⁻¹)	0,04	0,06
Límite de determinación (\pm g mL ⁻¹)	0,34	0,48
LD, Winefordner y Long (\pm g mL ⁻¹)	0,07	0,10
LD, Clayton (\pm g mL ⁻¹)	0,12	0,16

Tabla IV.1.A.21.- Parámetros de fiabilidad para **Neburón**.

	h_p (mV)	A_p (V/s)
Linealidad (1-DER (b)) %	98,2	98,5
Sensibilidad analítica (\pm g mL ⁻¹)	0,08	0,06
Límite de determinación (\pm g mL ⁻¹)	0,70	0,57
LD, Winefordner y Long (\pm g mL ⁻¹)	0,16	0,14
LD, Clayton (\pm g mL ⁻¹)	0,24	0,20

Como se dispone de tres réplicas para cada valor de concentración, se procede a la representación, Figura IV.1.A.13, de la desviación estándar relativa, DER (%), en función de cada una de las concentraciones empleadas en el calibrado.

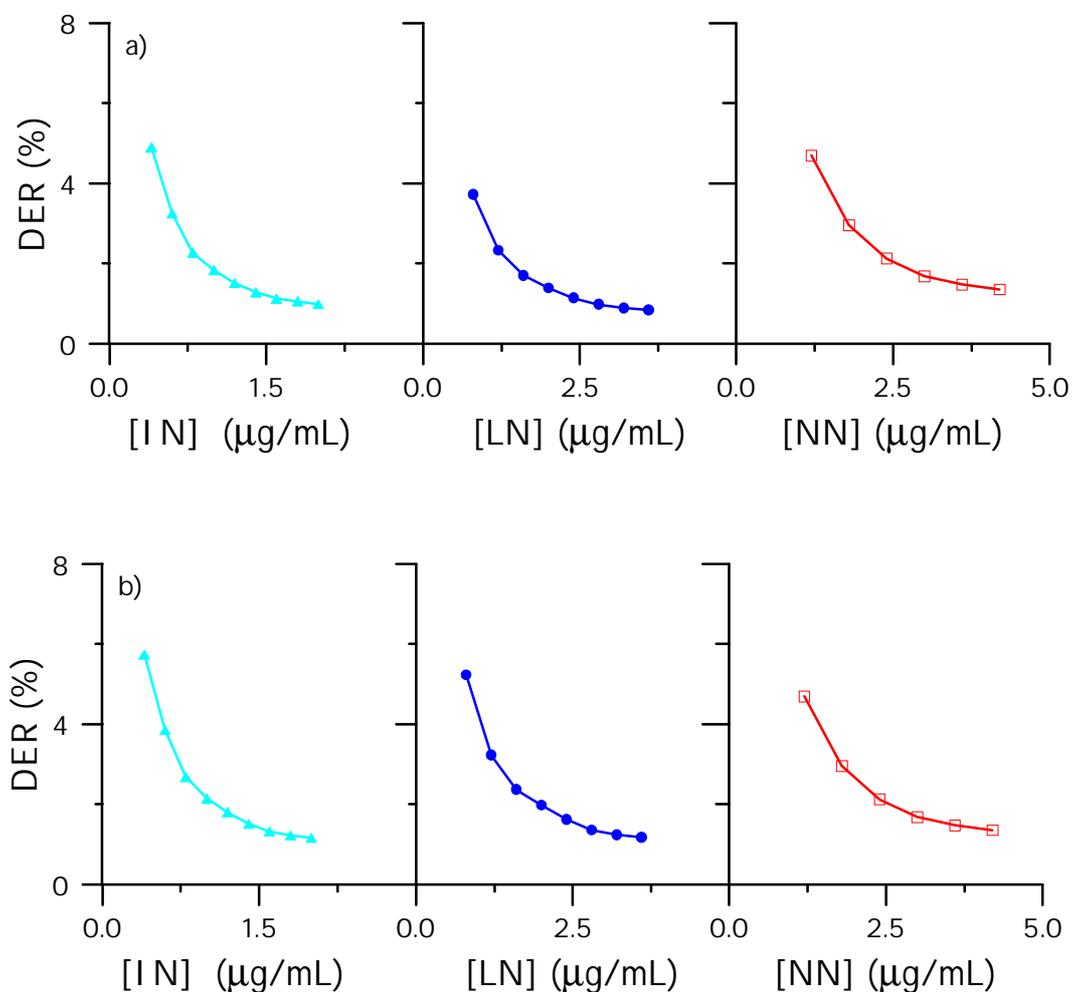


Figura IV.1.A.13. - Desviación estándar relativa para cada concentración de los herbicidas.

a) En función de la altura de pico

b) En función del área de pico.

IV.1.A.11.- Aplicación del método propuesto a la determinación y separación de fenilureas en agua

Tal y como ya se comentó en el Capítulo III, es fundamental el análisis de residuos de herbicidas en aguas, ya que el uso y abuso de estos compuestos químicos puede conducir a la presencia de éstos en niveles tóxicos, tanto para el ser humano como para los animales. El método ha sido aplicado a dos tipos de agua de distinta procedencia: agua natural del río Guadiana, a su paso por la ciudad de Badajoz, y agua de la red de abastecimiento de esta misma ciudad.

A) Tratamiento de la muestra

La toma de muestra, se llevó a cabo como ya se ha explicado en el apartado III.B.2.7.1. El pH medido para el agua de río y el agua de grifo fue de 8.3 y 8.0, respectivamente.

B) Extracción en fase sólida

Se trabajó con distintos volúmenes de agua, desde 10 a 500 mL, intentando siempre que los herbicidas fueran eluidos con el menor volumen de acetonitrilo posible, efectuando la máxima concentración de las muestras. Cuando se empleó 500 mL de agua, fue necesario pasar a través del sep-pak 5.0 mL de acetonitrilo para la elución completa de los tres herbicidas.

C) Método operatorio: Recuperaciones

Una vez comprobado que ninguna de estas aguas contenía residuos de los herbicidas estudiados, al menos en los niveles de concentración detectables por el método propuesto, se procedió al estudio de recuperación a varios niveles de concentración para comprobar la exactitud del método. Se llevó a cabo la experiencia tomando 300 mL de agua y enriqueciéndola con la cantidad de herbicida necesaria como para que, una vez concentrados, la cantidad de los mismos estuviese dentro de las rectas de calibrado establecidas.

El procedimiento a seguir es el que a continuación se indica:

- Se acondiciona el cartucho con 8.0 mL de acetonitrilo y la misma cantidad de agua ultrapura, para estirar las cadenas C_{18} que serán las encargadas de retener los analitos.
- Se pasan los 300 mL del agua contaminada a través del Sep-Pack o cartucho, a un flujo de 5 mL/min.
- Se lava el cartucho con dos fracciones de agua ultrapura de 5.0 mL.
- Se pasan dos fracciones de acetonitrilo:agua (1:4, v/v), para eliminar la señal de fondo presente en las aguas.
- Por último, se eluyen los herbicidas con 2.0 mL de acetonitrilo, que se inyectan en la columna o bien se llevan hasta un volumen final de 3.0 mL enrasando con tampón fosfato de concentración 0.01 M y pH 7.
- Cada uno de los herbicidas es detectado a su longitud de onda óptima.

Se preparó un blanco siguiendo el mismo procedimiento que para las muestras contaminadas, y fue aquí donde se comprobó que no existían residuos de los herbicidas en las aguas analizadas, al menos detectables por nuestro método. Se analizaron tres niveles de concentración, para dos muestras distintas y haciendo tres réplicas para cada una de ellas. Para cada nivel de concentración se inyectaron, en el cromatógrafo, 20 : L de muestra, por triplicado.

Los porcentajes de recuperación oscilaron entre el 88 y el 117%, en el agua potable, y el 89 y 115 %, en el agua de río, que se consideran satisfactorias y comparables con las encontradas en la bibliografía [1]. Gracias a la extracción en fase sólida, se consiguió detectar residuos de fenilureas del orden de las ppb (: $g L^{-1}$) . Las concentraciones de residuos permitidas para aguas superficiales están comprendidas entre 0.1 y 30 : $g L^{-1}$ [2,3].

Tras los resultados obtenidos se deduce que la metodología empleada es una herramienta útil y sencilla para llevar a cabo análisis de residuos en aguas naturales.

IV.1.A.12.- Método operatorio

Las muestras reales son tratadas como se ha descrito en la sección IV.1.A.11. Se propone el siguiente método operatorio:

Las rectas de calibrado se establecen preparando los correspondientes patrones en tubos desechables de 5.00 mL, en los que se introducen volúmenes crecientes de herbicida para que su concentración final esté comprendida dentro del rango de aplicación del método. Se adiciona 2.00 mL de tampón fosfato pH 7 y C = 0.01 M y acetonitrilo hasta enrase. Cada disolución se prepara por triplicado.

En la Tabla IV.1.A.26 se resumen los rangos de aplicación y longitudes de onda de excitación y emisión a emplear con cada mezcla ternaria.

Tabla IV.1.A.26.- Método operatorio.

COMPUESTO	Rango ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	$\lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{em}}$ (nm)
Diurón	0,6 - 3,6	324/403
Linurón	0,6 - 3,6	335/411
Neburón	0,9 - 4,8	326/385
Isoproturón	0,4 - 2,0	301/433
Linurón	0,8 - 3,6	335/411
Neburón	1,2 - 4,2	326/385

IV.1.B. - MEZCLA BINARIA (IN-DN)**IV.1.B.1. - Elección de la fase móvil**

Dado que la fase móvil ACN:tampón fosfato pH 7, C = 0.01M (60:40), v/v no resuelve la mezcla constituida por IN y DN, se decide ensayar otras fases móviles para lograr este objetivo. El tampón que se empleará será el de fosfato pH 7 C= 0.01 M, por ser el pH que mejores resultados aporta. En ese sentido, se probaron las siguientes fases móviles:

a) 2-PrOH:tampón

Dado que 2-PrOH es el disolvente en el que mayor señal de fluorescencia presentan las fenilureas, como primera alternativa, se ensaya la resolución de esta mezcla en 2-PrOH:tampón, en distintas proporciones. Se consigue una resolución total de ambos picos, $R > 1.5$ con la fase móvil 2-PrOH:tampón fosfato pH 7 C=0.01 M (25:75), v/v. Sin embargo, encontramos que cada uno de los picos llevaba asociado un hombro. Los tiempos de retención, en esas condiciones, fueron de 12.5 min para IN y 16.0 min para DN, como muestra la Figura IV.1.B.1.

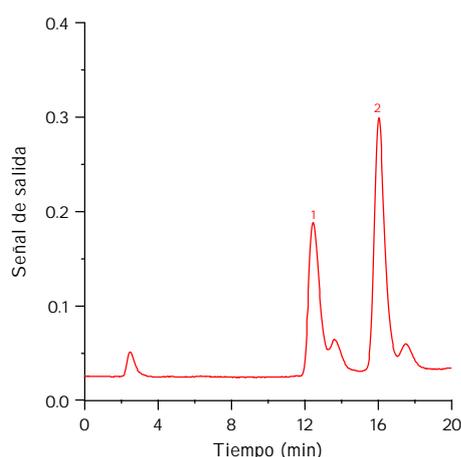


Figura IV.1.B.1. - Cromatograma obtenido para la separación de 1) IN y 2) DN en 2-PrOH:tampón pH 7 C 0.01 M, Caudal= 0.0.8 mL/min, [IN] = [DN] = 6.0 : g mL⁻¹, $\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 285/360$ nm.

b) 2-PrOH:ACN:tampón fosfato

Se decide modificar la fase móvil, antes ensayada, añadiendo diferentes volúmenes de ACN, para ver si desaparecen los hombros y disminuyen los tiempos de retención de ambos compuestos. En este caso, aparecen dos picos cuando se inyecta cada compuesto aisladamente, Figura IV.1.B.2.b). Cuando se inyecta conjuntamente I N y DN, Figura IV.1.B.2.a), sólo aparece un pico después de DN, puesto que el correspondiente a I N solapa con el pico principal de DN. Los tiempos de retención, en esas condiciones, fueron de 7.8 min para I N y 9.4 min para DN. El acetonitrilo hace que lo que antes aparecían como hombros, en cada pico, ahora se transformen en verdaderos picos.

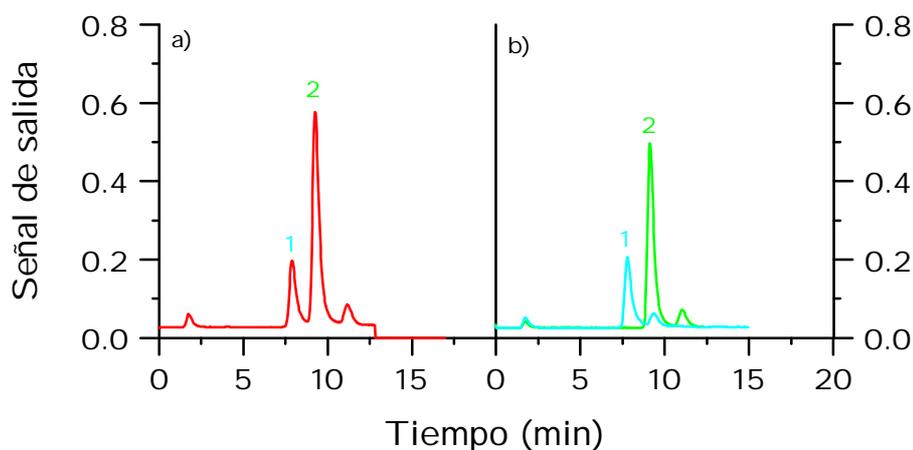


Figura IV.1.B.2. - Cromatograma obtenido para la separación de 1) I N y 2) DN. Fase móvil: 2-PrOH:ACN:tampón fosfato, pH 7, C= 0.01 M (25:10:75), v/v, Caudal= 0.8 mL/min, [I N] = [DN] = 10.0 : g mL⁻¹, $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ = 285/360 nm. a) inyección conjunta, b) inyección individual de cada herbicida.

La explicación que se puede dar a este hecho es que, dado que los compuestos son irradiados durante un determinado tiempo a su paso por el fotorreactor, éstos

se rompen dando lugar a varias especies, algunas de las cuales son fluorescentes y son las que se detectan. Pudiera ser, que en este medio se formaran dos fotoproductos susceptibles de emitir fluorescencia (aparecen dos picos), mientras que en otros medios, sólo se formaría uno de ellos, de ahí que sólo se obtenga un pico.

c) MeOH:tampón fosfato

En último lugar, se probó con la fase móvil constituida por MeOH:tampón fosfato, en distintas proporciones, encontrando que con (50:50), v/v, se conseguía resolver la mezcla, dentro de un tiempo prudencial, mayor que en los otros casos, pero sin la aparición de hombros ni picos secundarios.

Para la obtención de los cromatogramas no se han empleado las longitudes de onda óptimas en ese medio, porque se desconocen, de ahí que la siguiente experiencia a realizar sea la búsqueda de las longitudes de onda de excitación y emisión de estas especies, en el disolvente de separación elegido.

IV.1.B.2. - Espectros de excitación y emisión

Las condiciones utilizadas son:

- S = 800 V
- Rendijas de excitación y emisión = 4 nm
- $t_{irr} = 10-15$ minutos.
- $C_{herbicida} = 16 : g mL^{-1}$

En la Tabla IV.1.B.1 se resumen las longitudes de onda de excitación y emisión encontradas para cada compuesto. I soproturón presenta dos parejas de longitudes de onda en esas condiciones. La señal de fluorescencia es mayor a $\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 295/428$ nm, tal y como se observa en la Figura IV.1.B.3.

Tabla IV.1.B.1.- Longitudes de onda de excitación y emisión de las fenilureas en MeOH:tampón fosfato pH 7, C = 0.01 M (50:50) v/v.

COMPUESTO	$\lambda_{exc} / \lambda_{em}$ (nm)
Isoproturón	274 / 331
	295 / 428
Diurón	275 / 333

Los espectros obtenidos en ese medio no presentan valores de intensidad elevados, puesto que ya se ha dicho anteriormente que las mejores señales se obtienen en medio 2-PrOH y sus mezclas acuosas. Pese a ello, es necesario el uso de este nuevo disolvente para separar la mezcla I N-DN.

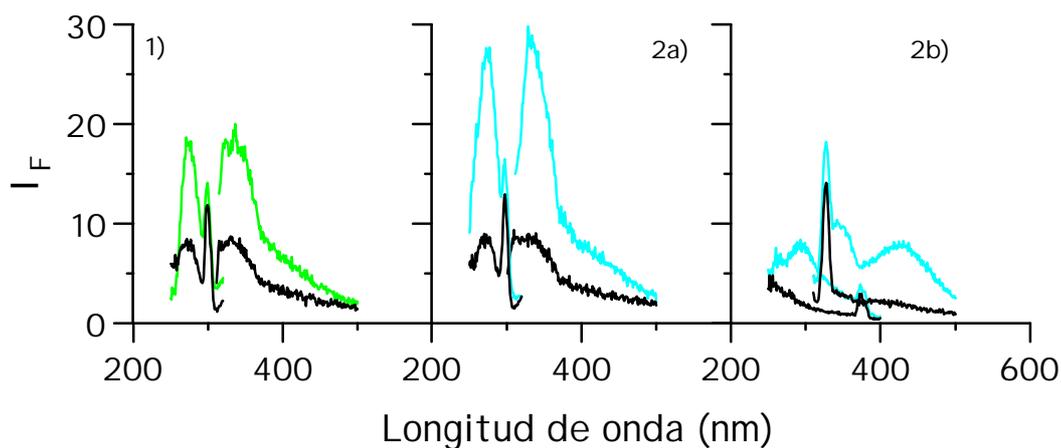


Figura IV.1.B.3.- Espectros de excitación y emisión de 1) DN, $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ = 275/333 nm y 2) IN, representándose en línea negra el blanco.

$$2a) \lambda_{exc}/\lambda_{em} = 295/428 \text{ nm}, 2b) \lambda_{exc}/\lambda_{em} = 274/331 \text{ nm}$$

Se registran los cromatogramas a las dos parejas de longitudes de onda de onda de IN, encontrándose picos mayores para IN cuando se detecta a $\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 295/428$ nm, Figura IV.1.B.4. En cuanto al segundo par de longitudes de onda de IN, 274/331, dada la proximidad a la de DN, 275/333, cuando se registra el cromatograma de IN se obtienen, prácticamente, los mismos resultados con ambas parejas de longitudes de onda.

Se podría programar el detector, para determinar ambos compuestos a sus longitudes de onda óptimas, IN a 295/428 nm y DN a 275/333 nm, pero dada la proximidad de ambos picos y la diferencia existente entre las parejas de λ no se realiza dicha programación. Para pasar de una pareja de longitudes de onda a otra, el detector hace el cero y el cromatograma produce una caída y subida de la señal, por lo que a la hora de medir se comete bastante error.

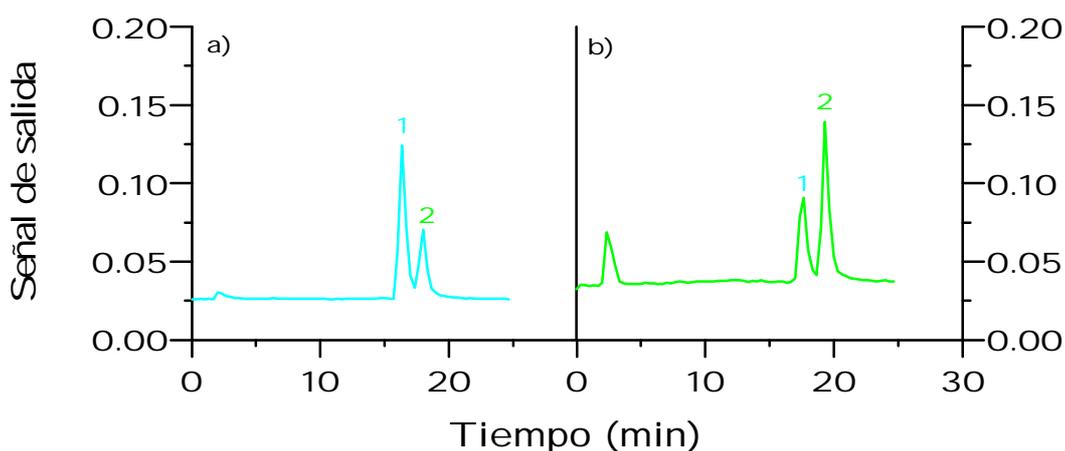


Figura IV.1.B.4. - Cromatogramas obtenidos para la separación de 1) IN y 2) DN. Fase móvil MeOH:tampón fosfato pH 7, C= 0.01 M (50:50), v/v, Caudal = 0.8 mL/min, [herbicida] = 8.0 : g mL⁻¹.

a) medidos a la longitud de onda óptima de **IN**, $\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 295/428$ nm.

b) medidos a la longitud de onda de **DN**, $\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 275/333$ nm.

En posteriores experiencias, se decide emplear como longitudes de onda de excitación y emisión las de DN, 275/333 nm, para la detección de ambos compuestos.

IV.1.B.3. - Rectas de calibrado

Una vez fijadas las condiciones de trabajo, se establecen las rectas de calibrado. Se prepara la fase móvil constituida por MeOH: tampón fosfato (50:50), v/v, pH 7 y $C = 0.01$ M y las disoluciones madre de DN e IN de $400 : \text{g mL}^{-1}$, en metanol. De ellas se toman distintas alícuotas para establecer la recta de calibrado, preparándose tres disoluciones diferentes para una misma concentración. La detección se realiza empleando como longitudes de onda de excitación y emisión 275/333 nm, respectivamente.

En los cromatogramas obtenidos, una vez que se han medido la altura y el área de cada pico, se establecen, mediante el método de mínimos cuadrados, los modelos lineales para cada herbicida en el intervalo de concentraciones estudiado. Los tiempos de retención (t_R), en minutos, factores de capacidad (K'), así como el intervalo de concentraciones, se recogen en la Tabla IV.1.B.2. La resolución entre ambos picos es de 1.6.

Tabla IV.1.B.2. - T_R , K' e intervalos de concentración encontrados para cada analito.

Compuesto	t_R (min)	(K')	Intervalo de concentración ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
I soproturón	16,6	6,2	4,0 - 20,0
Diurón	18,5	7,0	4,0 - 20,0

IV.1.B.3.1.- Ecuación de la recta de calibrado y parámetros estadísticos

En la Figura IV.1.B.5 se representan las rectas de calibrado correspondientes a IN y DN.

Los parámetros estadísticos que se derivan del análisis de las rectas obtenidos en la calibración univariante se recogen en las Tablas IV.1.B.3-4. También se incluye los valores de desviaciones estándar relativas, encontrados al examinar la repetitividad del método, empleando 11 réplicas, tanto para el área como para la altura de pico de ambos compuestos, para la concentración que se indica en la Tabla.

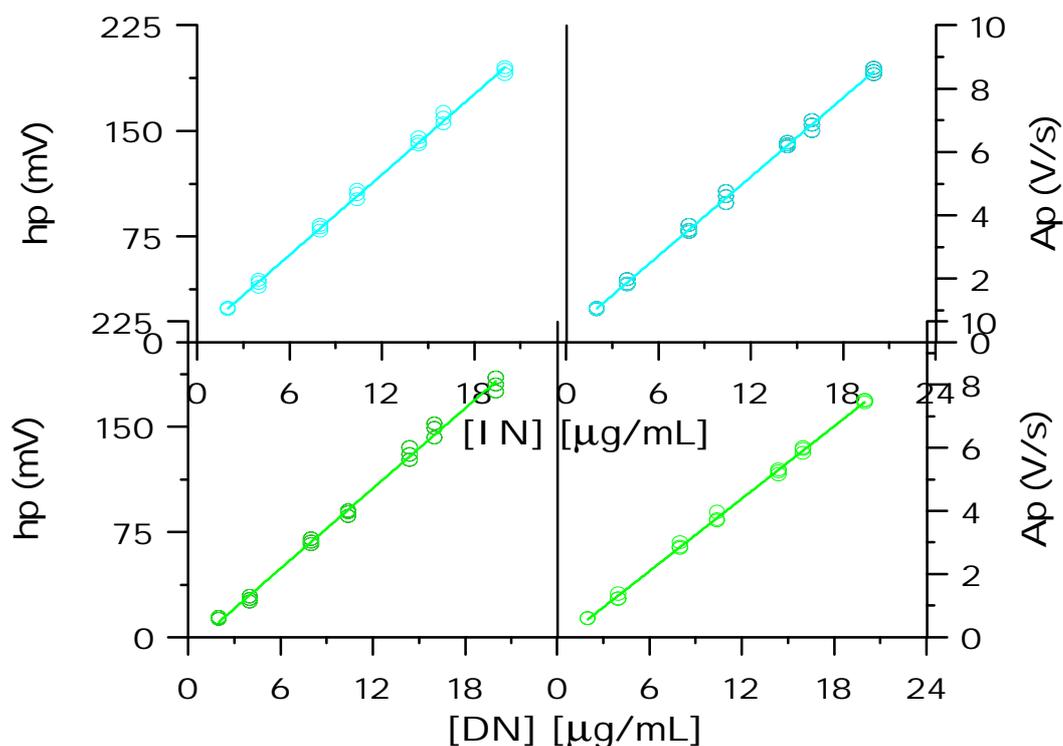


Figura VI .2.A.5. - Rectas de calibrado.

Tabla IV.1.B.3. - Parámetros estadísticos obtenidos para **Isopturón**.

	Altura de pico (mV)	Área de pico (V/s)
Ecuación de la recta	$H = 9,50C + 4,96$	$A = 0,415C + 0,23$
F _{pendiente}	0,13	0,005
F _{ordenada}	1,74	0,07
F _{regresión}	2,95	0,12
r	0,998	0,999
r ²	0,997	0,998
DER (%) (12.0 : g mL⁻¹)	1,00	0,89

Tabla IV.1.B.4. - Parámetros estadísticos obtenidos para **Diurón**.

	Altura de pico (mV)	Área de pico (V/s)
Ecuación de la recta	$H = 9,63C - 9,8$	$A = 0,385C - 0,24$
F _{pendiente}	0,17	0,004
F _{ordenada}	2,29	0,05
F _{regresión}	3,89	0,09
r	0,997	0,999
r ²	0,995	0,998
DER (%) (12.0 : g mL⁻¹)	1,32	0,77

IV.1.B.3.2.- Parámetros de fiabilidad. Repetitividad

En el cálculo del límite de detección, se ha utilizado el criterio de Winefordner y Long y el de Clayton. Los valores encontrados para los parámetros analíticos del método, calculados a partir del modelo de regresión, que utiliza los datos del calibrado, se reúne en las Tablas IV.1.B.5-6.

Tabla IV.1.B.5.- Parámetros de fiabilidad aplicando el modelo de regresión lineal para **Isoproturón**.

	h_p (mV)	A_p (V/s)
Linealidad (1-DER (b)) %	98,6	98,8
Sensibilidad analítica (: g mL ⁻¹)	0,31	0,28
Límite de determinación (: g mL ⁻¹)	3,50	3,10
LD, Winefordner y Long (: g mL ⁻¹)	0,55	0,50
LD, Clayton (: g mL ⁻¹)	0,90	0,80

Tabla IV.1.B.6.- Parámetros de fiabilidad aplicando el modelo de regresión lineal para **Diurón**.

	h_p (mV)	A_p (V/s)
Linealidad (1-DER (b)) %	98,2	98,9
Sensibilidad analítica (: g mL ⁻¹)	0,40	0,24
Límite de determinación (: g mL ⁻¹)	3,90	2,70
LD, Winefordner y Long (: g mL ⁻¹)	0,60	0,40
LD, Clayton (: g mL ⁻¹)	1,00	0,70

En la Figura IV.1.B.6 se representa las desviaciones estándar para cada concentración del calibrado y para cada uno de los herbicidas, en función del área y la altura de pico.

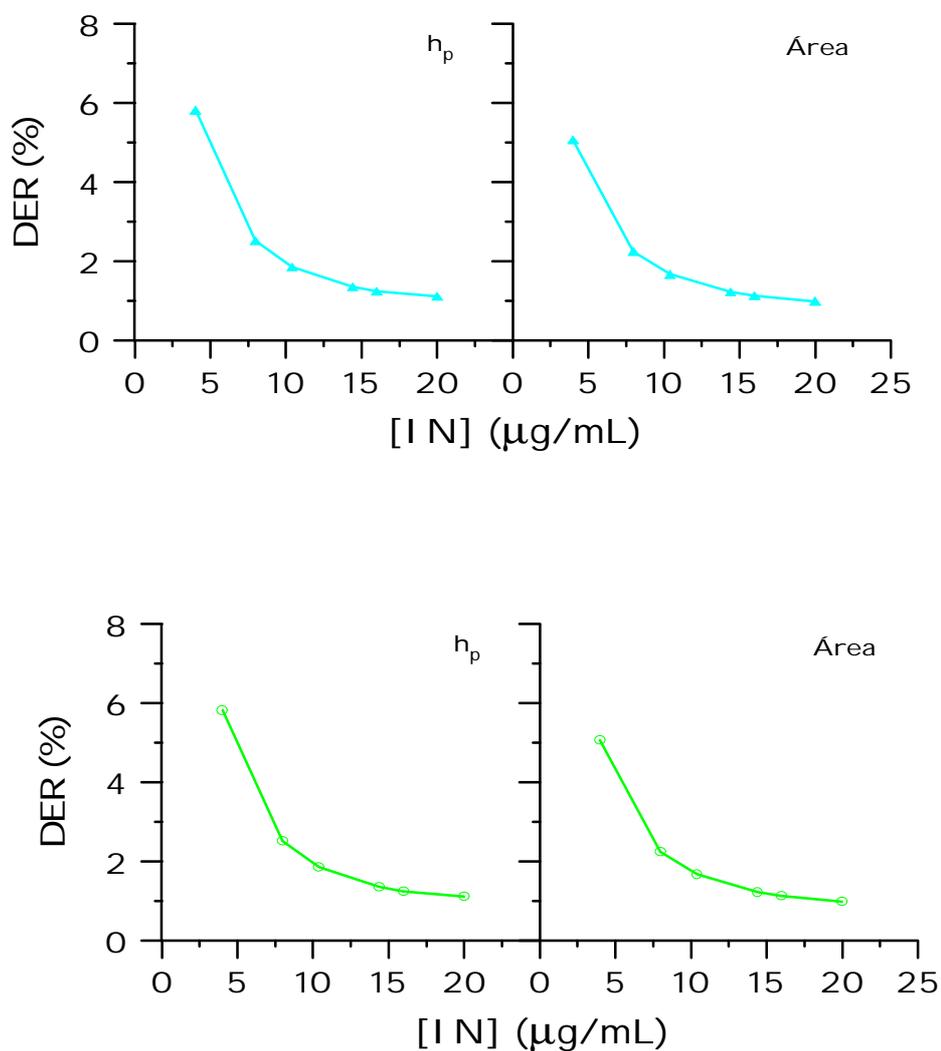


Figura IV.1.B.6. - Desviaciones estándar relativas.

IV.1.B.4.- Aplicación del método propuesto a la determinación y separación de la mezcla binaria en agua

A) Tratamiento de la muestra

Se siguió el mismo procedimiento que el citado en la resolución de mezclas ternarias.

B) Extracción en fase sólida

Este método consiste en hacer pasar la muestra de agua contaminada a través de un cartucho o Sep-Pak Plus C₁₈, previamente acondicionado con 8.0 mL de metanol y 8.0 mL de agua ultrapura, para activar las cadenas.

En este proceso se quedan retenidos IN y DN. Antes de la elución, es necesario "lavar" el Sep-Pak para eliminar las sustancias indeseables que pudieran quedar retenidas junto con los herbicidas objeto de estudio.

Por último, se eluyen los herbicidas retenidos con 2.5 mL de metanol, menor volumen no es posible, puesto que no se eluye totalmente DN.

C) Método operatorio: Recuperaciones

Al igual que se hizo en la resolución de mezclas ternarias, se toman 300 mL de agua enriqueciéndola con la cantidad de herbicida necesaria como para que, una vez concentrados, la cantidad de los mismos estuviese dentro de las rectas de calibrado establecidas.

El procedimiento a seguir es el que a continuación se indica:

- Se acondiciona el cartucho con 8.0 mL de MeOH y la misma cantidad de agua ultrapura, para estirar las cadenas C₁₈ que retendrán los analitos.

- Se pasan los 300 mL del agua contaminada a través del Sep-Pack o cartucho, a un caudal de 5 mL/min.

- Se lava el cartucho con dos fracciones de agua ultrapura de 5.0 mL.

- Se pasan tres fracciones de 5.0 mL de MeOH:H₂O (1:4, v/v), para eliminar la señal de fondo presente en las aguas.

- Por último, se eluyen los herbicidas con 2.5 mL de MeOH, que se llevan a un volumen final de 5.00 mL con tampón fosfato pH 7, C= 0.01 M. A continuación, se inyecta la disolución resultante. La pre-concentración que se consigue de este modo es de 60 veces.

Se efectuó un blanco siguiendo el mismo procedimiento que para las muestras contaminadas, y fue aquí donde se comprobó que no existían residuos de los herbicidas en las aguas analizadas, al menos detectables por nuestro método.

Se analizaron dos niveles de concentración, haciendo tres réplicas para cada una de ellas. Para cada nivel de concentración se inyectaron, por triplicado, 20 : L de muestra en el cromatógrafo, midiéndose las alturas y áreas de los picos . Los resultados obtenidos en los análisis se recogen en la Tabla VI .2.A.8.

Las recuperaciones obtenidas resultaron satisfactorias, en torno al 85 %, en ambos herbicidas. Además, hay que señalar que las concentraciones determinadas son de 10 y 15 : g L⁻¹, que son del orden de las que se recogen en la bibliografía [2,3] para aguas superficiales.

Si la muestra a analizar contuviera DN, IN, LN y NN, conjuntamente, se procedería determinando, en primer lugar, la mezcla formada por LN-NN, en las condiciones empleadas para la resolución de mezclas ternarias (IV.1.A.7). El primer

pico obtenido correspondería a la mezcla de DN e IN, y los dos picos siguiente a LN y NN. A continuación, se resolvería el pico correspondiente a DN e IN, en las condiciones dadas para la resolución de mezclas binarias (IV.1.B.3)

Tabla IV.1.B.8. - Recuperaciones obtenidas para IN y DN en muestras de agua de río contaminada.

C _{ad}	ISOPROTURÓN				DIURÓN			
	h _p (: g L ⁻¹)		A _p (: g L ⁻¹)		h _p (: g L ⁻¹)		A _p (: g L ⁻¹)	
	C _{enc}	% R	C _{enc}	% R	C _{enc}	% R	C _{enc}	% R
10,0	9,2	92	9,2	92	8,3	83	8,7	87
	8,7	87	8,8	88	8,0	80	8,3	83
	8,5	85	8,5	85	7,8	78	8,2	82
	8,8±0,4	88±4	8,8±0,4	88±4	8,0±0,3	80±0,3	8,4±0,3	84±3
15,0			13,3	89				
	13,0	87	13,0	87	13,0	87	13,3	89
	13,3	89	13,5	90	12,5	83	13,2	88
	13,7	91	13,3±0,3	89±2	12,3	82	12,7	85
	13,3±0,4	89±2			12,6±0,4	84±3	13,1±0,3	87±2

C_{ad}: concentración añadida.

C_{enc}: concentración encontrada.

R: recuperación

IV.1.B.5. - Bibliografía

- [1] A. Bautista, J.J. Aaron, M.C. Mahedero, A. Muñoz de la Peña, *Analisis*, 27 (1999) 857
- [2] A. Cappiello, G. Famiglioni, F. Bruner, *Anal. Chem.*, 66 (1994) 1416
- [3] M.C. Genaro, C. Abrigo, D. Giacosa, L. Rigotti, A. Liberatori, *J. Chromatogr.*, 718A (1995) 81

IV.2.- FENILUREAS Y PROPANIL

IV.2.1.- Espectros de excitación y emisión

IV.2.2.- Rectas de calibrado

IV.2.2.1.- Ecuación de la recta de calibrado y parámetros estadísticos.

IV.2.2.2.- Parámetros de fiabilidad. Repetitividad

IV.2.3.- Aplicación del método propuesto a la determinación y separación de las especies en agua

IV.2.4.- Método operatorio

g Este Estudio ha dado lugar al artículo: "High-performance liquid chromatographic determination of phenylureas by Photochemically-induced fluorescence detection", A. Muñoz de la Peña, M.C. Mahedero, A. Bautista-Sánchez, J. Chromatogr., 950 (2002) 287-291

Observaciones

U En las condiciones establecidas para la resolución de la mezcla de fenilureas se inyectan además Propanil y los fenoxiácidos 2,4-D, 2,4,5-T, MCPA y MCPP.

U El pico correspondiente a Propanil aparece entre Diurón (o Isoproturón) y Linurón, sin embargo, los fenoxiácidos no quedan retenidos en esas condiciones y salen con el frente.

U A continuación, se procede al estudio de mezcla cuaternarias compuesta por:

- I N-Propanil-LN-NN
- DN-Propanil-LN-NN

U Las condiciones que emplearemos serán las mismas que las ya optimizadas para la determinación y separación de las mezclas ternarias de fenilureas.

IV.2.1.- Espectros de excitación y emisión

En primer lugar, es necesario saber cuales son las longitudes de onda de excitación y emisión del nuevo herbicida que se incluye en la mezcla, Propanil, para lo que se emplearon como condiciones instrumentales las siguientes:

- Sensibilidad = 800 V
- Rendijas de excitación y emisión = 4 nm
- $t_{irr} = 10$ minutos.

Asimismo, se utilizó como fase móvil ACN:tampón fosfato (60:40), v/v, pH 7, C=0.01 M y una concentración de herbicida de 2.0 : g mL⁻¹. Las longitudes de onda de emisión y excitación encontradas para Propanil son 368 y 455 nm, respectivamente. En la Figura IV.2.1 se muestran los espectros correspondientes a este herbicida.

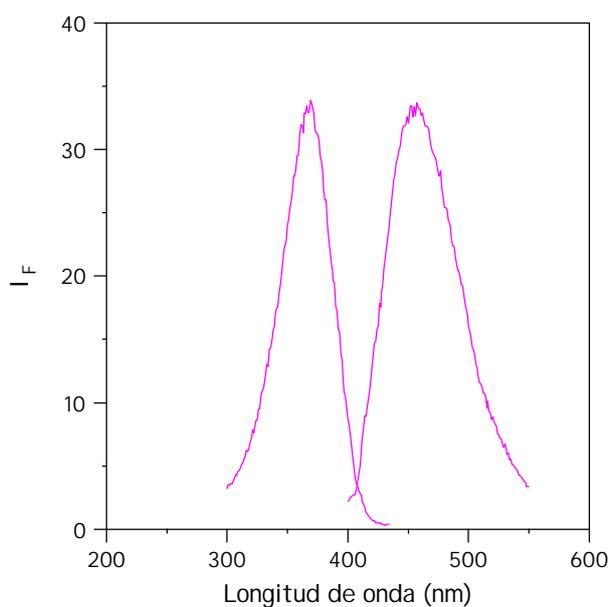


Figura IV.2.1.- Espectros de excitación y emisión de **Propanil**.

IV.2.2.- Rectas de calibrado

Las condiciones elegidas para el establecimiento de las rectas de calibrado son las mismas que las que se describen en el Sub-capítulo IV.1.A.11 y que a continuación recordamos.

Se prepara la fase móvil constituida por ACN: tampón fosfato (60:40), v/v, pH 7 y C = 0.01 M, y disoluciones madre de DN, IN, LN y NN de 400 : g mL⁻¹ y Propanil de 500 : g mL⁻¹, en ACN. A continuación, se prepara una única disolución que contiene la mezcla de los 4 herbicidas en menor concentración. De ella se toman distintas alícuotas para establecer la recta de calibrado.

Se preparan tres disoluciones diferentes para una misma concentración y cada una de estas disoluciones es asimismo inyectada por triplicado.

El espectrofluorímetro se programa para que cada uno de los herbicidas sea detectado a su longitud de onda óptima, la cual se presenta en la Tabla IV.2.1, así como los tiempos de retención (t_R) a los que aparecen los analitos, factores de capacidad (K'), resolución entre los picos (R) y el intervalo de concentraciones ensayado para las dos mezclas.

En los cromatogramas obtenidos, una vez que se han medido la altura y el área de cada pico, se establecen, mediante el método de mínimos cuadrados, los modelos lineales para cada herbicida en el intervalo de concentraciones estudiado.

Tabla IV.2.B.1.- Longitudes de onda óptimas, t_R , K' , R e intervalo de concentraciones ensayados para los herbicidas que constituyen las mezclas estudiadas.

Mezcla 1 ^a	$\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ (nm)	t_R (min)	K'	R	Intervalo de concentración (: g mL ⁻¹)
Diurón	324/403	6,4	0,64	-	0,4 - 3,2
Propanil	368/455	7,9	1,00	2.2	0,2 - 1,6
Linurón	335/411	8,8	1,26	1.4	0,4 - 2,8
Neburón	326/385	12,7	2,26	5.3	0,6 - 4,8
Isoproturón	301/433	6,3	0,60	-	0,5 - 2,4
Propanil	368/455	7,9	1,00	2.5	0,2 - 1,0
Linurón	335/411	8,8	1,24	1.3	0,5 - 2,4
Neburón	326/385	12,7	2,24	5.7	0,5 - 2,4

En la Figura IV.2.2 se representan los cromatogramas correspondientes a las dos mezclas cuaternarias, en las condiciones óptimas de análisis.

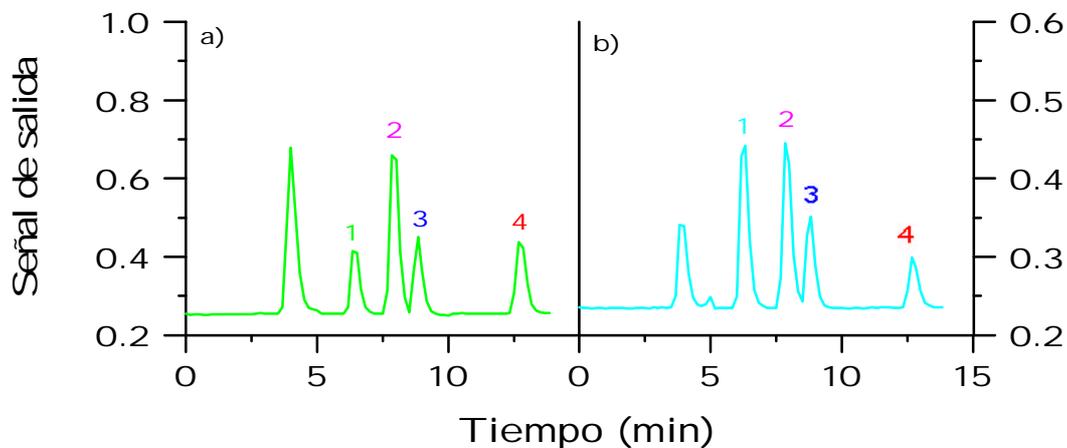


Figura IV.2.2.- Cromatogramas obtenidos empleando como fase móvil ACN:tampón fosfato (60:40), v/v, Caudal = 0.4 mL/min, para la separación de las dos mezclas en la concentración que se indica.

a) 1) DN, 2) Propanil, 3) LN, 4) NN, 2.0, 1.0, 2.0, 3.0 : g mL⁻¹, respectivamente.

b) 1) IN, 2) Propanil, 3) LN, 4) NN, 1.2, 0.5, 1.2, 1.2 : g mL⁻¹, respectivamente.

VI.2.2.1.- Ecuación de la recta de calibrado y parámetros estadísticos.

En las Figuras IV.2.3-6 se representan las rectas de calibrado correspondientes a las mezclas DN-Propanil-LN-NN e IN-Propanil-LN-NN.

También se recogen los parámetros estadísticos obtenidos en la calibración univariante, Tablas IV.2.2-9. Se incluyen, además, los valores de las desviaciones estándar relativas, encontrados al examinar la repetitividad del método, para una serie de 11 muestras, para la concentración que se indica en la Tabla.

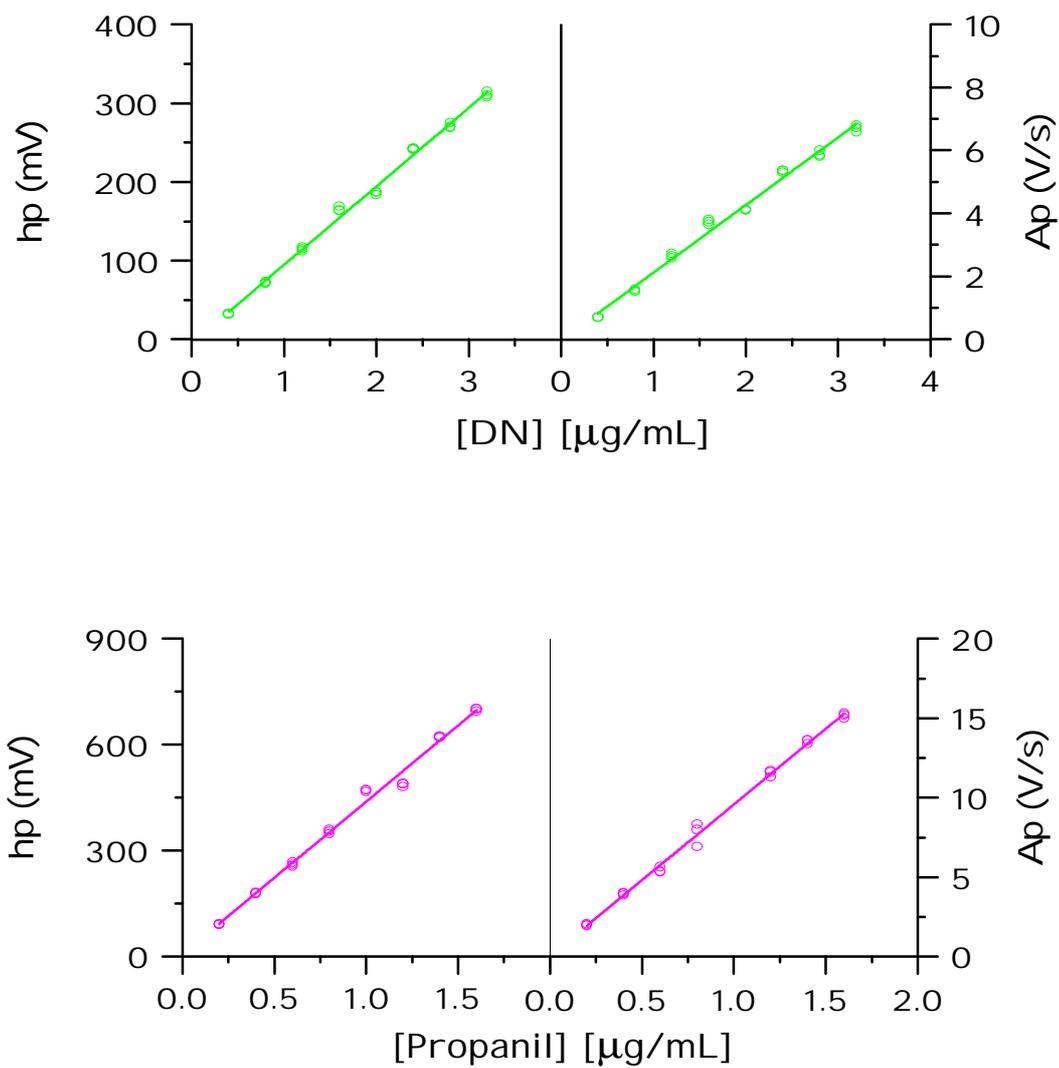
g Mezcla DN-Propanil-LN-NN

Figura IV.2.3.- Rectas correspondientes a DN y Propanil

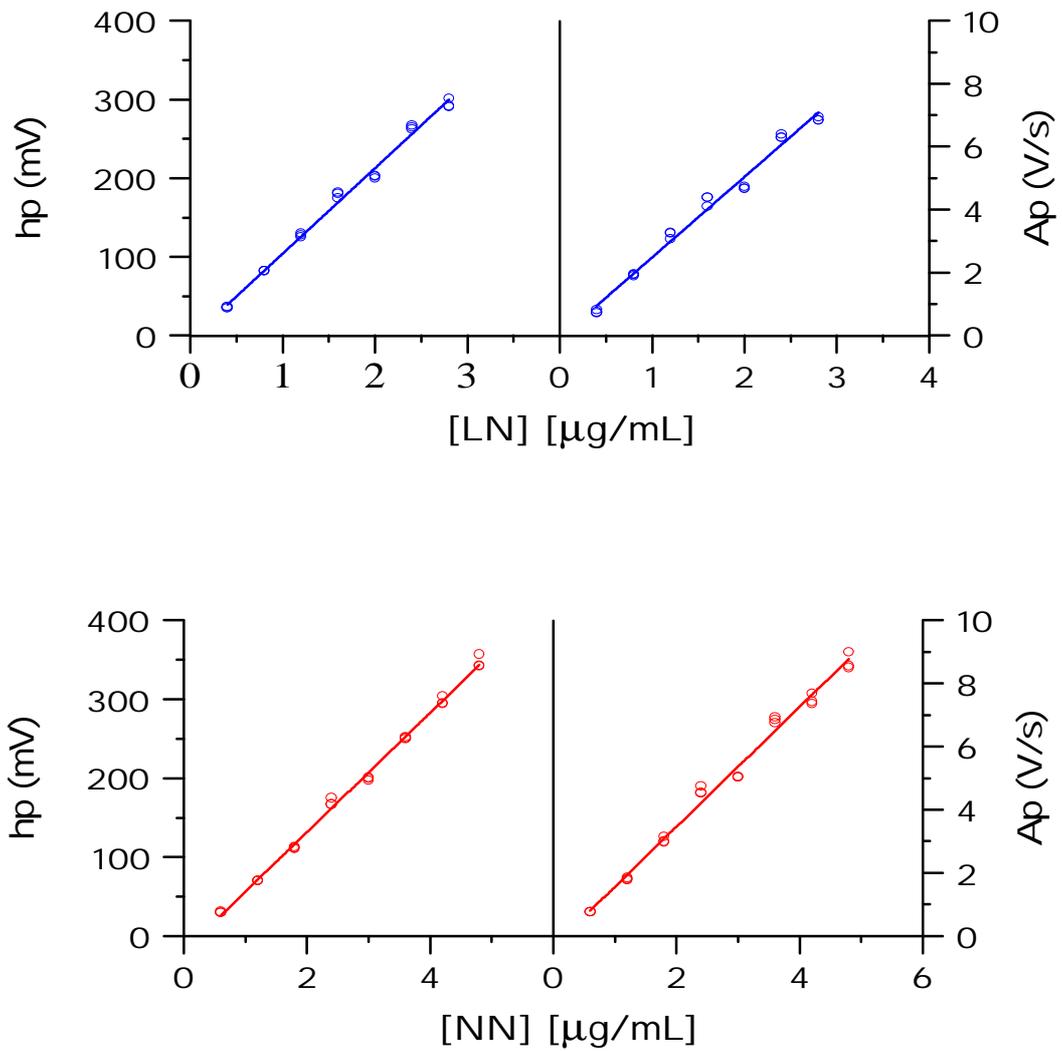


Figura IV.2.4.- Rectas correspondientes a LN y NN.

Tabla IV.2.2.- Parámetros estadísticos obtenidos para Diurón.

	Altura de pico (mV)	Área de pico (V/s)
Ecuación de la recta	$H = 99,70C - 5.13$	$A = 2,15C - 0.03$
$F_{\text{pendiente}}$	1,44	0,04
F_{ordenada}	2,92	0,09
$F_{\text{regresión}}$	6,49	0,19
r	0,998	0,996
r^2	0,996	0,992
DER (%) (2,00 : g mL ⁻¹)	1,43	1,56

Tabla IV.2.3.- Parámetros estadísticos obtenidos para Propanil.

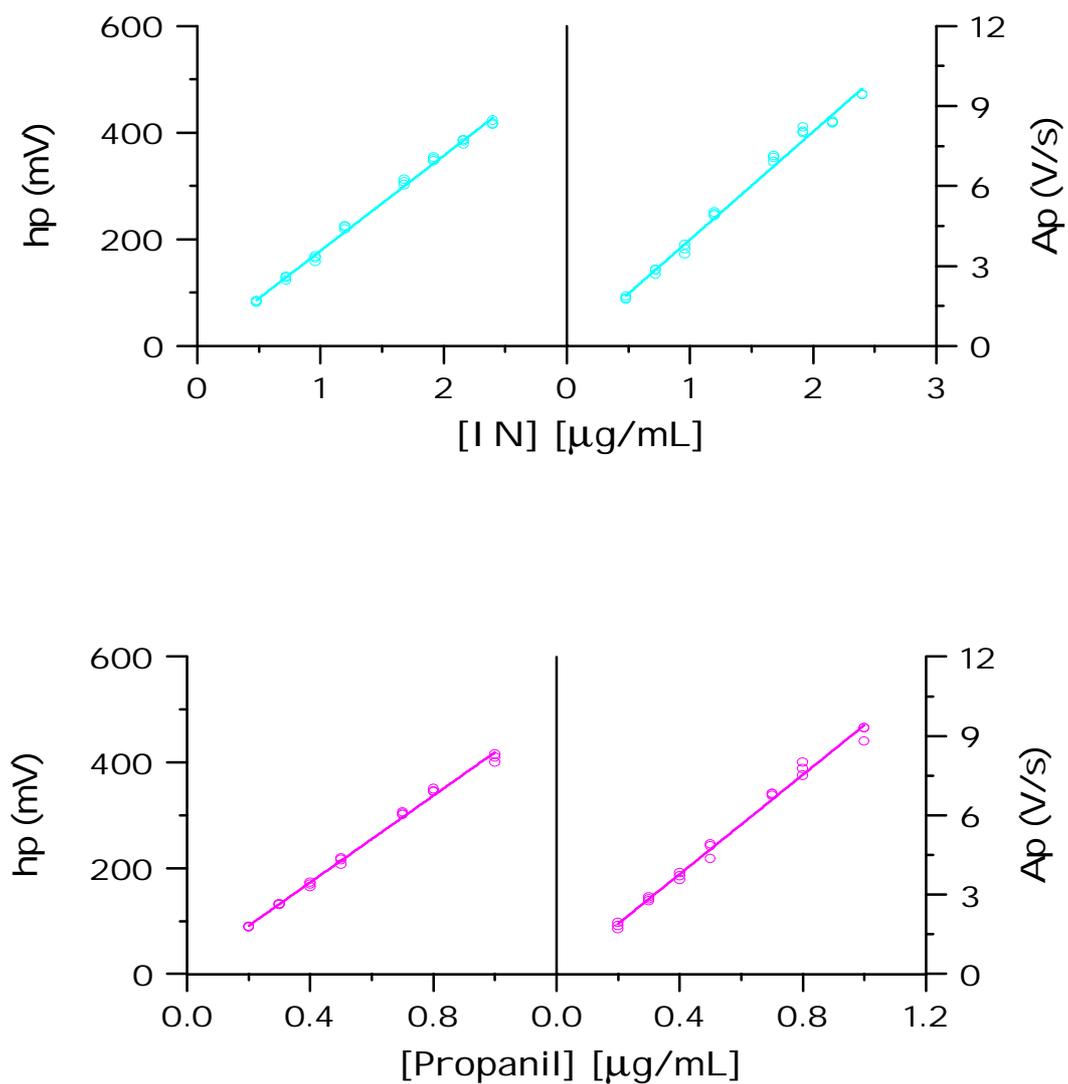
	Altura de pico (mV)	Área de pico (V/s)
Ecuación de la recta	$H = 432,20C + 6,56$	$A = 9,54C + 0,03$
$F_{\text{pendiente}}$	8,54	0,14
F_{ordenada}	8,63	0,14
$F_{\text{regresión}}$	19,18	0,31
r	0,996	0,998
r^2	0,994	0,996
DER (%) (1,00 : g mL ⁻¹)	1,00	0,95

Tabla IV.2.4.- Parámetros estadísticos obtenidos para **Linurón**.

	Altura de pico (mV)	Área de pico (V/s)
Ecuación de la recta	H = 108,60C - 4,43	A = 2,56C - 0,08
F _{pendiente}	2,08	0,07
F _{ordenada}	3,72	0,12
F _{regresión}	7,62	0,26
r	0,997	0,993
r ²	0,994	0,986
DER (%) (2,00 : g mL⁻¹)	1,45	1,60

Tabla IV.2.5.- Parámetros estadísticos obtenidos para **Neburón**.

	Altura de pico (mV)	Área de pico (V/s)
Ecuación de la recta	H = 75,48C - 19,12	A = 1,90C - 0,34
F _{pendiente}	0,90	0,04
F _{ordenada}	2,73	0,12
F _{regresión}	6,06	0,26
r	0,998	0,995
r ²	0,996	0,99
DER (%) (3,00 : g mL⁻¹)	1,50	1,65

G Mezcla IN-Propanil-LN-NN**Figura IV.2.5.-** Rectas de calibrado correspondientes a **IN** y **Propanil**.

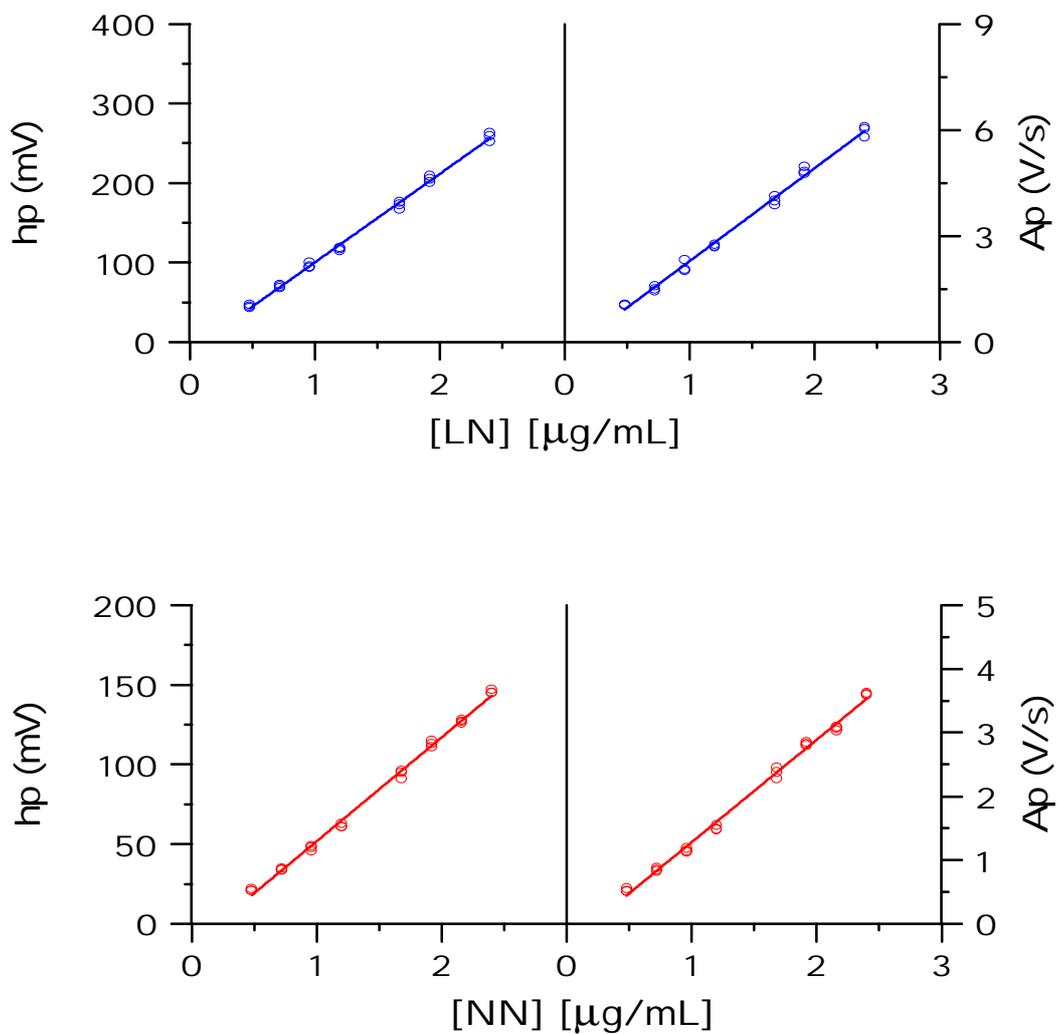


Figura IV.2.6.- Rectas de calibrado correspondientes a LN y NN

Tabla IV.2.6.- Parámetros estadísticos obtenidos para **Isopturón**.

	Altura de pico (mV)	Área de pico (V/s)
Ecuación de la recta	$H = 178,30C + 0,34$	$A = 4,05C - 0,06$
F _{pendiente}	2,38	0,08
F _{ordenada}	3,77	0,13
F _{regresión}	7,68	0,26
r	0,998	0,996
r ²	0,996	0,992
DER (%) (1,70 : g mL⁻¹)	0,98	1,40

Tabla IV.2.7.- Parámetros estadísticos obtenidos para **Propanil**.

	Altura de pico (mV)	Área de pico (V/s)
Ecuación de la recta	$H = 410,10C + 9,03$	$A = 9,38C + 0,01$
F _{pendiente}	6,27	0,2
F _{ordenada}	3,87	0,12
F _{regresión}	7,66	0,24
r	0,998	0,996
r ²	0,996	0,992
DER (%) (0,70 : g mL⁻¹)	1,10	1,60

Tabla IV.2.8.- Parámetros estadísticos obtenidos para Linurón.

	Altura de pico (mV)	Área de pico (V/s)
Ecuación de la recta	H = 111,20C - 11,12	A = 2,63C - 0,34
F _{pendiente}	1,50	0,05
F _{ordenada}	2,23	0,07
F _{regresión}	4,41	0,12
r	0,998	0,997
r ²	0,996	0,994
DER (%) (1,70 : g mL ⁻¹)	1,00	1,20

Tabla IV.2.9.- Parámetros estadísticos obtenidos para Neburón.

	Altura de pico (mV)	Área de pico (V/s)
Ecuación de la recta	H = 65,16C - 0,13	A = 1,61C - 0,32
F _{pendiente}	0,81	0,02
F _{ordenada}	1,28	0,04
F _{regresión}	2,60	0,08
r	0,998	0,997
r ²	0,996	0,994
DER (%) (1,70 : g mL ⁻¹)	0,90	1,10

IV.2.2.2.- Parámetros de fiabilidad. Repetitividad

La estimación de todos los parámetros analíticos del método, calculados a partir del modelo de regresión, que utiliza los datos del calibrado, se reúne en las Tablas IV.2.10-17, para las dos mezclas posibles.

G [Mezcla DN-Propanil-LN-NN](#)

Tabla IV.2.10.- Parámetros de fiabilidad aplicando el modelo de regresión lineal para **Diurón**.

	h_p (mV)	A_p (V/s)
Linealidad (1-DER (b)) %	98,6	98,0
Sensibilidad analítica (\therefore g mL ⁻¹)	0,06	0,09
Límite de determinación (\therefore g mL ⁻¹)	0,60	0,84
LD, Winefordner y Long (\therefore g mL ⁻¹)	0,09	0,12
LD, Clayton (\therefore g mL ⁻¹)	0,16	0,23

Tabla IV.2.11.- Parámetros de fiabilidad aplicando el modelo de regresión lineal para **Propanil**.

	h_p (mV)	A_p (V/s)
Linealidad (1-DER (b)) %	98,0	98,6
Sensibilidad analítica (\therefore g mL ⁻¹)	0,04	0,03
Límite de determinación (\therefore g mL ⁻¹)	0,41	0,30
LD, Winefordner y Long (\therefore g mL ⁻¹)	0,06	0,04
LD, Clayton (\therefore g mL ⁻¹)	0,11	0,08

Tabla IV.2.12.- Parámetros de fiabilidad aplicando el modelo de regresión lineal para **Linurón**.

	h_p (mV)	A_p (V/s)
Linealidad (1- DER (b)) %	98,1	97,3
Sensibilidad analítica (\pm g mL ⁻¹)	0,07	0,10
Límite de determinación (\pm g mL ⁻¹)	0,68	0,97
LD, Winefordner y Long (\pm g mL ⁻¹)	0,10	0,15
LD, Clayton (\pm g mL ⁻¹)	0,18	0,26

Tabla IV.2.13.- Parámetros de fiabilidad aplicando el modelo de regresión lineal para **Neburón**.

	h_p (mV)	A_p (V/s)
Linealidad (1- DER (b)) %	98,8	98.0
Sensibilidad analítica (\pm g mL ⁻¹)	0,08	0,14
Límite de determinación (\pm g mL ⁻¹)	0,74	1,29
LD, Winefordner y Long (\pm g mL ⁻¹)	0,19	0,19
LD, Clayton (\pm g mL ⁻¹)	0,20	0,35

G Mezcla IN-Propanil-LN-NN

Tabla IV.2.14.- Parámetros de fiabilidad aplicando el modelo de regresión lineal para **Isoproturón**.

	h_p (mV)	A_p (V/s)
Linealidad (1- $DER(b)$) %	98,7	98.0
Sensibilidad analítica (\pm g mL ⁻¹)	0,04	0,06
Límite de determinación (\pm g mL ⁻¹)	0,42	0,63
LD, Winefordner y Long (\pm g mL ⁻¹)	0,06	0,09
LD, Clayton (\pm g mL ⁻¹)	0,11	0,16

Tabla IV.2.15.- Parámetros de fiabilidad aplicando el modelo de regresión lineal para **Propanil**.

	h_p (mV)	A_p (V/s)
Linealidad (1- $DER(b)$) %	98,5	97,9
Sensibilidad analítica (\pm g mL ⁻¹)	0,02	0,03
Límite de determinación (\pm g mL ⁻¹)	0,19	0,26
LD, Winefordner y Long (\pm g mL ⁻¹)	0,03	0,04
LD, Clayton (\pm g mL ⁻¹)	0,05	0,07

Tabla IV.2.16.- Parámetros de fiabilidad aplicando el modelo de regresión lineal para **Linurón**.

	h_p (mV)	A_p (V/s)
Linealidad (1-DER (b)) %	98,7	98,3
Sensibilidad analítica (\pm g mL ⁻¹)	0,05	0,04
Límite de determinación (\pm g mL ⁻¹)	0,40	0,49
LD, Winefordner y Long (\pm g mL ⁻¹)	0,06	0,08
LD, Clayton (\pm g mL ⁻¹)	0,10	0,13

Tabla IV.2.17.- Parámetros de fiabilidad aplicando el modelo de regresión lineal para **Neburón**.

	h_p (mV)	A_p (V/s)
Linealidad (1-DER (b)) %	98,8	98,5
Sensibilidad analítica (\pm g mL ⁻¹)	0,05	0,04
Límite de determinación (\pm g mL ⁻¹)	0,39	0,49
LD, Winefordner y Long (\pm g mL ⁻¹)	0,06	0,07
LD, Clayton (\pm g mL ⁻¹)	0,10	0,13

En cuanto a la repetitividad, en las Figuras IV.2.7-10 se representan las desviaciones estándar relativas para cada concentración, en función de la altura y el área de pico.

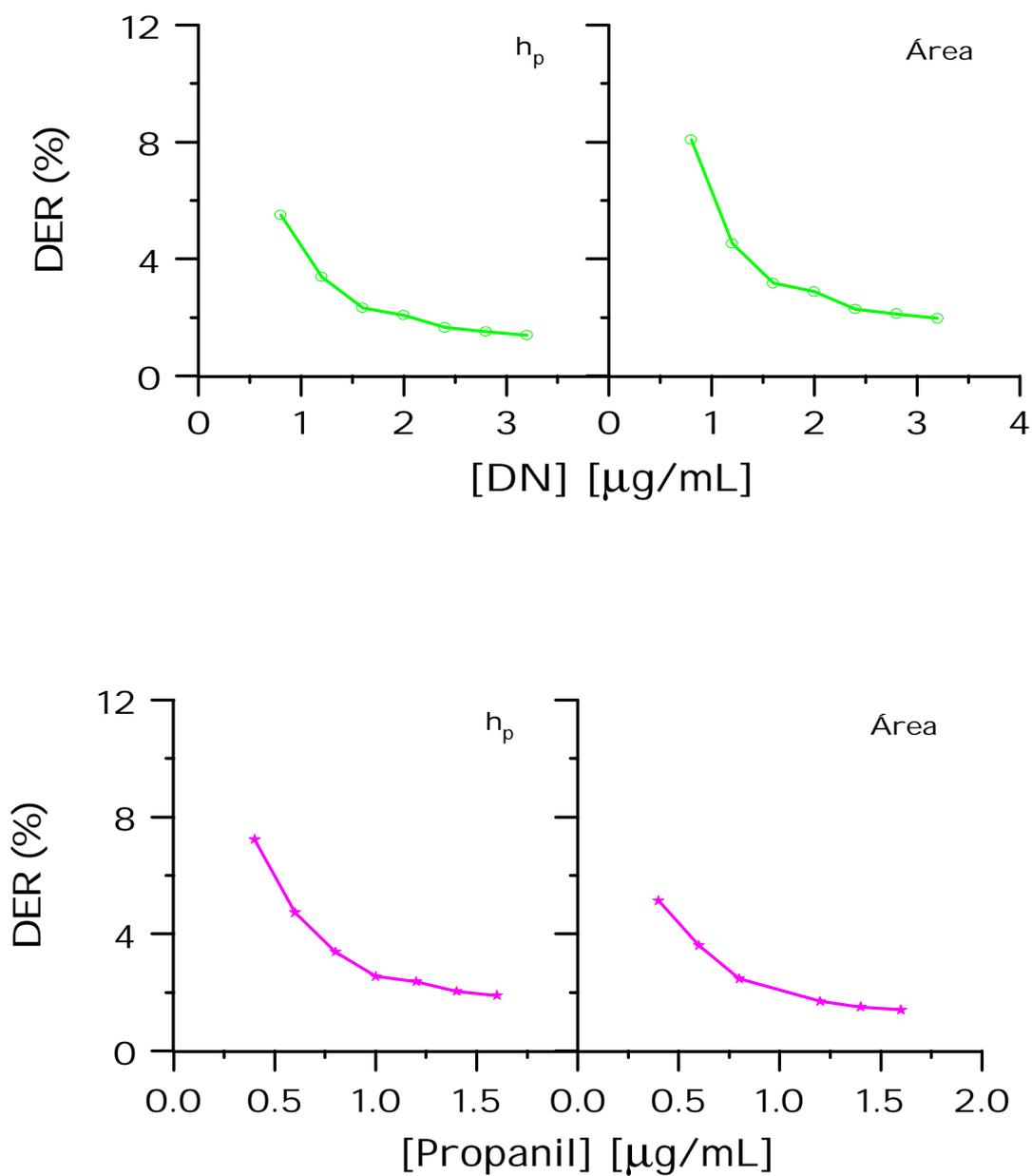
g Mezcla DN-Propanil-LN-NN

Figura IV.2.7. - Desviación estándar relativa de DN y Propanil, en función de la altura y del área de pico.

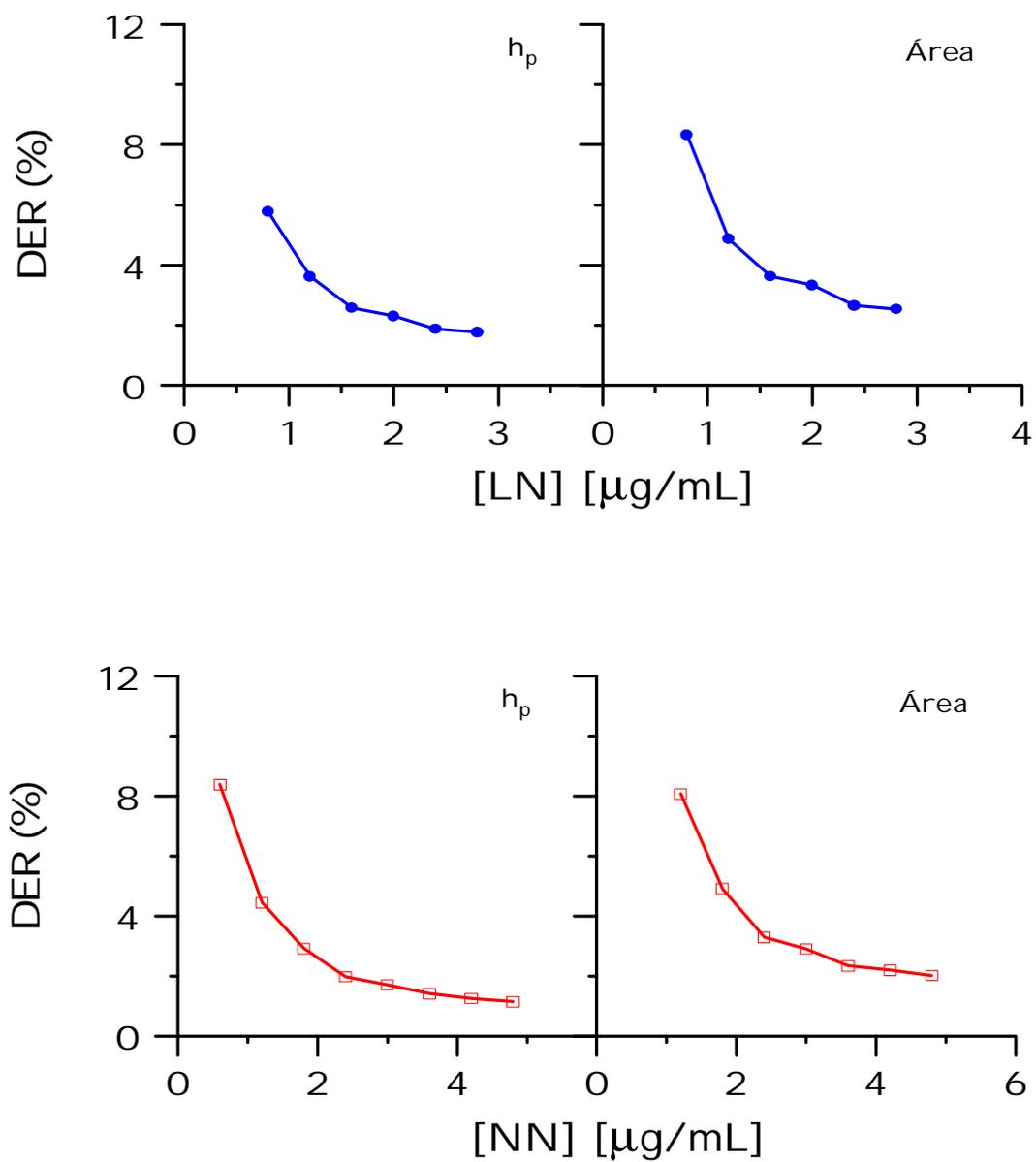


Figura IV.2.8.- Desviación estándar relativa de LN y NN, en función de la altura y del área de pico.

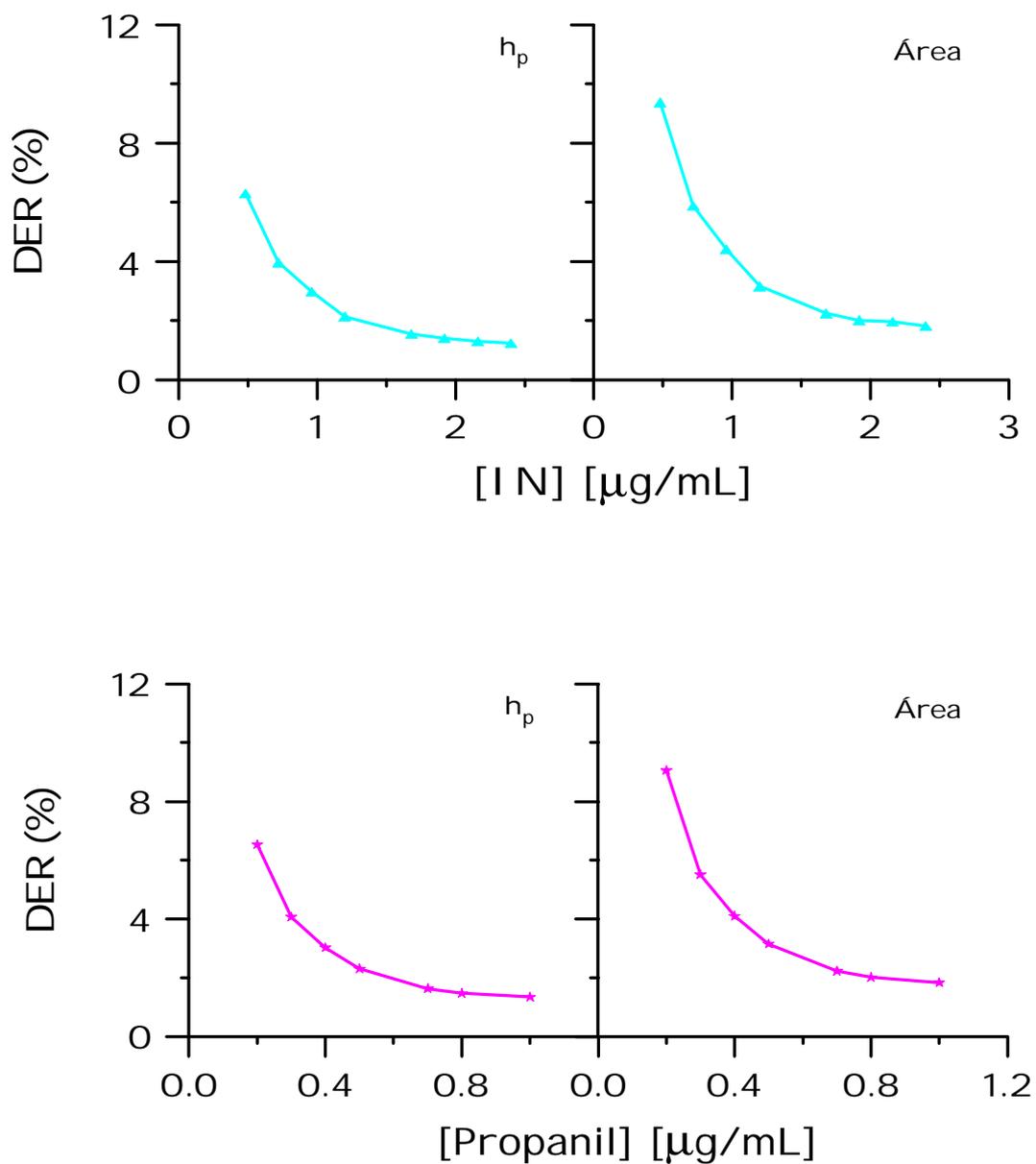
g Mezcla IN-Propanil-LN-NN

Figura IV.2.9. - Desviación estándar relativa de **IN** y **Propanil**, en función de la altura y del área de pico.

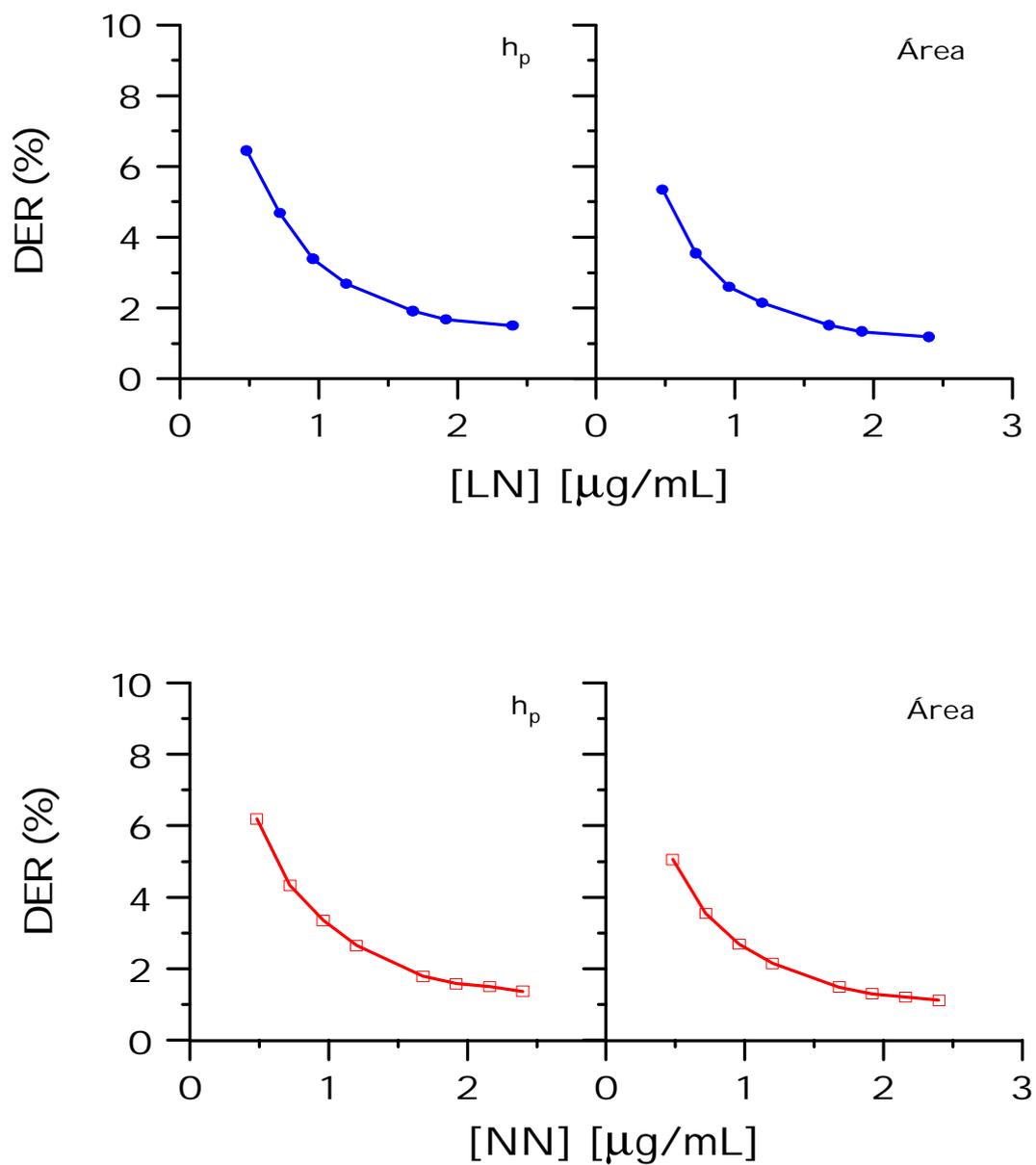


Figura IV.2.10.- Desviación estándar relativa de LN y NN, en función de la altura y del área de pico.

IV.2.3.- Aplicación del método propuesto a la determinación y separación de las especies en agua

Este método se aplicó a la determinación de las especies en agua del río Guadiana. Se siguió el mismo procedimiento que el que se empleó en las mezclas ternarias. Los resultados obtenidos se muestran en las Tablas IV.2.18-19. En ellas, se recoge la concentración media así como la desviación estándar de las 6 réplicas analizadas para cada compuesto.

Las recuperaciones oscilaron entre el 78 y el 94 %, para la mezcla DN-Propanil-LN-NN, y entre el 84 y el 100 %, para la otra mezcla, I N-Propanil-LN-NN.

En todos los casos se observa que las recuperaciones son satisfactorias, aunque están más próximas al 100 % cuando se considera el área de pico, como señal analítica.

IV.2.4.- Método operatorio

Es el mismo que el que se describe en el apartado IV.1.A.11.

Estudios fosforimétricos

1.- Se concluye que para la obtención de señales de emisión de fosforescencia a temperatura ambiente reproducibles, en disoluciones de ciclodextrinas, es necesario un estricto control de todos los parámetros que influyen en la reacción, tales como tiempo de paso de N_2 , adición de Na_2SO_3 , tiempo de agitación de las muestras para formar el complejo de inclusión, así como tiempo de medida de la señal de fosforescencia.

2.- Se proponen métodos de determinación de NAA y NAAM en β -CD, basados en la optimización y medida de la señal de RTP obtenida, empleando por primera vez 1,3-DBPropano como átomo pesado externo, comprobándose que 1,3-DBPropano es más efectivo que 1,2-DBEtano, para la obtención de emisión de fosforescencia, en estos sistemas.

3.- La aparición de turbidez, en consonancia con los trabajos realizados por otros autores, resulta condición necesaria para obtener señales de fosforescencia suficientemente intensas, en los sistemas en estudio.

Estudios de fluorescencia fotoinducida

4.- Se realiza un estudio de las propiedades fluorescentes de herbicidas de la familia de las fenilureas, DN, IN, LN y NN; de los fenoxiácidos, 2,4-D, 2,4,5-T, MCPA y MCPP y de Propanil, empleando disoluciones hidroalcohólicas y medios organizados (ciclodextrinas y micelas). Dichas especies no presentan fluorescencia nativa pero ésta puede inducirse fotoquímicamente mediante irradiación UV.

5.- Se establecen las condiciones operatorias así como los parámetros de calidad (límites de detección y cuantificación, intervalo de linealidad, desviación estándar relativa), concluyendo que esta metodología permite establecer métodos de determinación de los herbicidas estudiados, que son aplicados a aguas de distinta procedencia.

6.- Se determinan las estequiometrias así como las constantes de formación de los complejos que forman las fenilureas con β -CD y HP- β -CD. Las primeras resultan ser 1:1 y las constantes de formación varían entre 125 ± 12 y $1500 \pm 245 \text{ M}^{-1}$, en función de la estructura de la fenilurea estudiada y el tipo de CD empleada.

7.- Se hace uso de medios micelares, SDS y CTAC, para estudiar y optimizar las señales de fluorescencia inducida fotoquímicamente de las fenilureas anteriores.

8.- En esas condiciones, se establecen métodos simples y reproducibles, adecuados para el análisis de residuos de estos herbicidas, en muestras de agua, necesitándose un equipo de bajo costo, pre-tratamiento de las muestras sencillo y no siendo necesario el aislamiento de los fotoproductos para realizar las aplicaciones analíticas.

Estudios cromatográficos

9.- Se optimizan tanto las variables instrumentales como químicas, que permiten proponer métodos de determinación de los herbicidas en estudio, mediante HPLC con derivatización post-columna, utilizando radiación UV, y detección mediante fluorescencia fotoinducida.

10.- Se resuelven mezclas binarias, ternarias y cuaternarias de las fenilureas y Propanil, encontrando que los fenoxiácidos se eluyen con el frente, en las condiciones óptimas establecidas.

11.- Los métodos anteriores se aplican, con buenos resultados, a la determinación de residuos de estos herbicidas en aguas de distinta procedencia. En todos los casos, las recuperaciones obtenidas resultan satisfactorias. El método incluye un pre-tratamiento mediante extracción en fase sólida (SPE).

A: Absorción

ACN: Acetonitrilo

ANS: 8-Anilil-naftalen-1-sulfonato

A_p: Área de pico

BCH: Bromociclohexano

BN: 6-Bromo-2-naftol

C_{ad}: Concentración añadida

CD-RTP: Fosforescencia a temperatura ambiente con ciclodextrinas

C_{enc}: Concentración encontrada

LL: Cromatografía Líquido Líquido

CLS: Cromatografía líquido sólido

CG: Cromatografía de gases

c.m.c.: Concentración micelar crítica

CPB: Bromuro de cetilpiridinio

CTAC: Cloruro de cetiltrimetilamonio

CTAB: Bromuro de cetiltrimetilamonio

DE: Diámetro externo

DER: Desviación estándar relativa

DI: Diámetro interno

DN: Diurón

DM- β -CD: Heptakis-o-dimetil- β -CD

DMSO: Dimetilsulfóxido

EPA: Agencia de Protección Medioambiental

FAO: Food Agriculture Organization

FIA: Análisis por inyección en flujo

FIM: Factor de incremento micelar

H: Altura de plato

HAI -RTP: Fosforescencia a temperatura ambiente inducida por átomo pesado

HAP: Hidrocarburos aromáticos polinucleares

h_p: Altura de pico

HP- β -CD: Hidroxipropil- β -ciclodextrina

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución

IC: Conversión interna

IN: Isoproturón

IR: Infrarrojo

ISC: Cruce entre sistemas

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry

LD: Límite de detección

LD₅₀: Dosis letal media

LQ: Límite de determinación o cuantificación

LIF: Fluorescencia inducida por láser

LIP: Fosforescencia inducida por láser

LN: Linurón

LTP: Fosforescencia a baja temperatura

NAA: Ácido 1-naftilacético

NAAM: Naftalenacetamida

MCPA: Ácido 2-metil-4-cloro-fenoxiacético

MCPP: Ácido 2-metil-4-cloro-fenoxi-2-propiónico

MEKC: Cromatografía electrocinética micelar

MeOH: Metanol

ME-RTP: Fosforescencia a temperatura ambiente en microemulsiones

MLR: Límite máximo de residuos

MS-RTP: Fosforescencia a temperatura ambiente en medios micelares

- N:** Naftaleno o Número de platos teórico
- NN:** Neburón
- NP-RTP:** Fosforescencia a temperatura ambiente en medios no protegidos
- ODS:** Octadecilsilano
- OPA-MERC:** Orto-ftalato-2-mercaptoetanol
- PIF:** Fluorescencia inducida fotoquímicamente
- PTFE:** Politetrafluoroetileno o teflón
- R:** Resolución entre dos picos
- RMN:** Resonancia magnética nuclear
- RTP:** Fosforescencia a temperatura ambiente
- SM-RTP:** Fosforescencia a temperatura ambiente de un agregado supramolecular
- SS-RTP:** Fosforescencia a temperatura ambiente en soporte sólido
- SDS:** Dodecilsulfato sódico
- SDBS:** Dodecilbencenosulfonato sódico
- THF:** Tetrahidrofurano
- t_d:** Tiempo de decaimiento, demora o espera
- t_g:** Tiempo de integración
- t_{irr}:** Tiempo de irradiación
- t_R:** Tiempo de retención
- TM- ϕ -CD:** Heptakis-o-triimetil- ϕ -CD
- TNS:** 6-(-p-Toluidil-naftalen-2-sulfonato)
- UV:** Ultravioleta
- 1-BrN:** 1-Bromonaftaleno
- 1,2-DBEtano:** 1,2-Dibromoetano
- 1,2-DBPropano:** 1,2-Dibromopropano
- 1,3-DBPropanol:** 1,3-Dibromopropanol
- 2-Betanol:** 2-Bromoetanol

2-PrOH: 2-Propanol

2,3-DBPropanol: 2,3-Dibromopropanol

2,4-D: Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

2,4,5-T: Ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético

"-CD: "-Ciclodextrina

\$-CD: \$-Ciclodextrina

(-CD: (-Ciclodextrina

8: Longitud de onda

J: Tiempo de vida

I.- INTRODUCCIÓN

I.A.- Herbicidas

I.A.1.- Plaguicidas: clasificación	2
I.A.2.- La mala hierba y su papel	5
I.A.3.- Perjuicios causados por las malas hierbas	5
I.A.4.- Causas del desarrollo de los herbicidas	8
I.A.5.- Características de los herbicidas. Métodos de análisis	16
I.A.5.1.- Fitohormonas	16
- Ácido 1-naftilacético	19
- Naftalenacetamida	20
- Derivados de ácidos	21
I.A.5.2.- Combinaciones nitrogenadas	26
- Fenilureas	29
- Propanil	37
I.A.6.- Terminología específica	48
I.A.7.- Bibliografía	51

I.B.- Medios organizados

I.B.1.- Medios micelares	55
I.B.1.1.- Características y propiedades	55
I.B.1.2.- Aplicaciones analíticas	62
I.B.2.- Ciclodextrinas	69
I.B.2.1.- Estructura y propiedades	69
I.B.2.2.- Formación de complejos de inclusión	74
I.B.2.3.- Toxicidad	78
I.B.2.4.- Aplicaciones industriales y farmacéuticas	79
I.B.2.5.- Aplicaciones analíticas	83
I.B.3.- Bibliografía	92

I.C.- Luminiscencia molecular

I.C.1.- Fundamentos	107
I.C.2.- Fosforescencia a temperatura ambiente	115
I.C.2.1.- Clasificación	117
A.- RTP en soporte sólido	117
B.- RTP en disolución	118
B.1.- Sensibilizada	118
B.2.- En medios organizados	119
B.3.- En medios no protegidos	120
I.C.3.- Fosforescencia a temperatura ambiente en presencia de ciclodextrinas	125
I.C.3.1.- Requisitos para la obtención de RTP en disoluciones de ciclodextrinas	125
I.C.3.2.- Átomos pesados usados en la obtención de RTP	126
I.C.3.3.- Revisión bibliográfica	128
I.C.4.- Bibliografía	146

I.D.- Fluorescencia inducida fotoquímicamente a temperatura ambiente

I.D.1.- Fundamento teórico	154
I.D.2.- Tipos de reacciones	160
I.D.3.- Instrumentación	162
I.D.4.- Aplicaciones analíticas	166
I.D.5.- Bibliografía	178

II. - REACTIVOS, APARATOS Y PROGRAMAS EMPLEADOS

II.1.- Disoluciones y reactivos	184
II.2.- Instrumentación	188
II.3.- Programas informáticos	192
II.4.- Bibliografía	192

III.- ESTUDIOS LUMINISCENTES

III.A.- Estudio espectrofluorimétrico y fosforimétrico de los complejos de inclusión que forma ácido 1-naftilacético y naftalenacetamida con β -CD y 1,3- dibromopropano

III.A.1.- Estudios espectrofluorimétricos

III.A.1.1.- Espectros de excitación y emisión	196
III.A.1.2.- Estabilidad de las disoluciones	197
III.A.1.3.- Influencia del contenido de 1,3 -dibromopropano	199
III.A.1.4.- Influencia del tiempo de agitación	200
III.A.1.5.- Influencia del contenido de 1,3 -dibromopropano, en presencia de β -ciclodextrina	201

III.A.2.- Estudios fosforimétricos.- Obtención de RTP

III.A.2.1.- Espectros de emisión de los complejos ternarios formados	205
III.A.2.2.- Influencia del tiempo de medida	207
III.A.2.3.- Influencia del contenido de sulfito sódico	208
III.A.2.4.- Influencia del tiempo de agitación	210
III.A.2.5.- Influencia del paso de nitrógeno	212
III.A.2.6.- Influencia del contenido de 1,3-dibromopropano	213
III.A.2.7.- Influencia de la concentración de β -ciclodextrina	214
III.A.2.8.- Rectas de calibrado	216
III.A.2.8.1.- Ecuación de la recta de calibrado y parámetros estadísticos	217
III.A.2.8.2.- Parámetros de fiabilidad	222
III.A.2.8.3.- Método operatorio	229

III.A.3.- Influencia del tipo de átomo pesado en la señal de RTP

III.A.4.- Estudio microscópico y modelación molecular de los complejos de inclusión	
III.A.4.1.- Estudio microscópico	232
III.A.4.1.- Estudio mediante modelación molecular	233
III.A.4.1.- Discusión	236
III.A.5.- Bibliografía	237

III.B.- Estudio espectrofluorimétrico de las fenilureas en distintos medios

III.B.1.- En ausencia de medios organizados

III.B.1.1.- Elección del disolvente óptimo	240
III.B.1.2.- Espectros de excitación y emisión	242
III.B.1.3.- Estabilidad de las disoluciones	244
III.B.1.4.- Influencia del tiempo de irradiación	248
III.B.1.5.- Estabilidad de los fotoproductos	250
III.B.1.6.- Rectas de calibrado	252
III.B.1.6.1.- Ecuación de la recta de calibrado y parámetros estadísticos	254
III.B.1.6.2.- Parámetros de fiabilidad. Repetitividad	258
III.B.1.7.- Método operatorio	262

III.B.2.- Estudio espectrofluorimétrico de los complejos de inclusión que forman las fenilureas con hidroxipropil- β -ciclodextrina y β -ciclodextrina

III.B.2.1.- Espectros de excitación y emisión	266
III.B.2.2.- Estabilidad de las disoluciones	268
III.B.2.3.- Influencia del tiempo de irradiación	269
III.B.2.4.- Influencia del pH	271

III.B.2.5.- Estabilidad de los fotoproductos	277
III.B.2.6.- Rectas de calibrado	277
III.B.2.6.1.- Ecuación de la recta de calibrado y parámetros estadísticos	278
III.B.2.6.2.- Parámetros de fiabilidad. Repetitividad	279
III.B.2.7.- Aplicación del método a la determinación de estas fenilureas en agua	280
III.B.2.7.1.- Tratamiento de la muestra	282
III.B.2.7.2.- Extracción en fase sólida	282
III.B.2.7.3.- Recuperaciones	283
III.B.2.8.- Método operatorio	284
III.B.2.9.- Determinación de la estequiometría y constante de formación del complejo de inclusión entre los herbicidas y las ciclodextrinas	285
III.B.2.9.1.- Fundamento teórico	285
III.B.2.9.2.- Influencia de la concentración de ciclodextrina	289
III.B.2.9.3.- Cálculo de las estequiometrías y constantes de inclusión de los complejos formados	291
III.B.2.10.- Bibliografía	300

III.B.3.- Estudio espectrofluorimétrico de las fenilureas en medios micelares

III.B.3.1.- Comparación de las señales en medio acuoso y 2-propanol	304
III.B.3.2.- Efecto del pH	306
III.B.3.3.- Influencia del tiempo de irradiación	306
III.B.3.4.- Efecto del tiempo de irradiación en la señal del disolvente	313
III.B.3.5.- Efecto de la concentración de SDS y CTAC	314
III.B.3.6.- Estabilidad del fotoproducto	315
III.B.3.7.- Rectas de calibrado	316

III.B.3.7.1.- Ecuación de la recta y parámetros estadísticos . . .	317
III.B.3.7.2.- Parámetros de fiabilidad. Repetitividad	320
III.B.3.8.- Aplicación del método propuesto a la determinación de fenilureas en agua	322
III.B.3.9.- Método operatorio	328
III.B.3.10.- Bibliografía	330

III.C.- Estudio espectrofluorimétrico de los fenoxiácidos (2,4-D, 2,4,5-T, MCPP, MCPA) y Propanil

III.C.1.- Espectros de excitación y emisión	332
III.C.2.- Influencia del tiempo de irradiación y del pH	335
III.C.3.- Espectros de absorción de los herbicidas	341
III.C.4.- Influencia de la concentración de la disolución reguladora . .	343
III.C.5.- Estabilidad del fotoproducto	343
III.C.6.- Rectas de calibrado	345
III.C.6.1.- Ecuación de la recta y parámetros estadísticos	346
III.C.6.2.- Parámetros de fiabilidad. Repetitividad	349
III.C.7.- Método operatorio	351
III.C.8.- Bibliografía	352

IV.- ESTUDIOS CROMATOGRÁFICOS. RESOLUCIÓN DE MEZCLAS

IV.1.- Fenilureas

IV.1.A.- MEZCLAS TERNARIAS

IV.1.A.1.- Generalidades de la cromatografía	355
IV.1.A.2.- Elección de la fase móvil	362

g Mezcla compuesta por DN-LN-NN

IV.1.A.3.- Condiciones de trabajo	367
IV.1.A.4.- Elección del caudal	368
IV.1.A.5.- Influencia del pH y la concentración de tampón	371
IV.1.A.6.- Espectros de excitación y emisión	372
IV.1.A.7.- Rectas de calibrado	373
IV.1.A.7.1.- Ecuación de la recta de calibrado Y parámetros estadísticos	375
IV.1.A.7.2.- Parámetros de fiabilidad. Repetitividad	378

g Mezcla compuesta por IN-LN-NN

IV.1.A.8.- Influencia del caudal	381
IV.1.A.9.- Espectros de excitación y emisión	382
IV.1.A.10.- Rectas de calibrado	383
IV.1.A.10.1.- Ecuación de la recta de calibrado y parámetros estadísticos	384
IV.1.A.10.2.- Parámetros de fiabilidad. Repetitividad	387
IV.1.A.11.- Aplicación del método propuesto a la determinación y separación de fenilureas en agua	389
IV.1.A.12.- Método operatorio	392

IV.1.B.- MEZCLA BINARIA (DN-IN)

IV.1.B.1.- Elección de la fase móvil	393
IV.1.B.2.- Espectros de excitación y emisión	395
IV.1.B.3.- Rectas de calibrado	398
IV.1.B.3.1.- Ecuación de la recta de calibrado y parámetros estadísticos	399
IV.1.B.3.2.- Parámetros de fiabilidad. Repetitividad	401

IV.1.B.4.- Aplicación del método propuesto a la determinación y separación de la mezcla binaria en agua	403
IV.1.B.5.- Bibliografía	405

IV.2.- Fenilureas y Propanil

IV.2.1.- Espectros de excitación y emisión	408
IV.2.2.- Rectas de calibrado	409
IV.2.2.1.- Ecuación de la recta de calibrado y parámetros estadísticos	411
IV.2.2.2.- Parámetros de fiabilidad. Repetitividad	420
IV.2.3.- Aplicación del método propuesto a la determinación y separación de las especies en agua	428
IV.2.4.- Método operatorio	428

Conclusiones	429
-------------------------------	------------

Abreviaturas	431
-------------------------------	------------

Índice	435
-------------------------	------------