

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA Y ANÁLISIS  
INSTRUMENTAL



APLICACIÓN DE LA  
ELECTROFORESIS CAPILAR CON DETECCIÓN DUAL  
A LA DETERMINACIÓN DE AMITROL EN MUESTRAS  
MEDIAMBIENTALES Y AGROALIMENTARIAS.  
ESTUDIO ELECTROANALÍTICO Y APLICACIONES.

TESIS DOCTORAL

MÓNICA MORENO BARAMBIO

MADRID, NOVIEMBRE DE 2006



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA Y ANÁLISIS  
INSTRUMENTAL

APLICACIÓN DE LA  
ELECTROFORESIS CAPILAR CON DETECCIÓN DUAL  
A LA DETERMINACIÓN DE AMITROL EN MUESTRAS  
MEDIAMBIENTALES Y AGROALIMENTARIAS.  
ESTUDIO ELECTROANALÍTICO Y APLICACIONES.

TESIS DOCTORAL

MÓNICA MORENO BARAMBIO

MADRID, NOVIEMBRE DE 2006



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA Y ANÁLISIS  
INSTRUMENTAL

APLICACIÓN DE LA  
ELECTROFORESIS CAPILAR CON DETECCIÓN DUAL  
A LA DETERMINACIÓN DE AMITROL EN MUESTRAS  
MEDIAMBIENTALES Y AGROALIMENTARIAS.  
ESTUDIO ELECTROANALÍTICO Y APLICACIONES.

**Memoria para optar al grado de  
Doctor en Ciencias Químicas,  
que presenta la licenciada  
MÓNICA MORENO BARAMBIO**

MADRID, NOVIEMBRE DE 2006



**D. MANUEL CHICHARRO SANTAMARÍA** y **Dña. ESPERANZA BERMEJO BENITO**, Profesores Titulares del Departamento de Química Analítica y Análisis Instrumental de la Universidad Autónoma de Madrid.

INFORMAN:

Que la presente Memoria titulada

**“Aplicación de la electroforesis capilar con detección dual a la determinación de amitrol en muestras medioambientales y agroalimentarias. Estudio electroanalítico y aplicaciones”.**

ha sido realizada en los laboratorios de este Departamento, bajo nuestra dirección por la licenciada Dña. MÓNICA MORENO BARAMBIO.

Y para que así conste, firmamos y expedimos el presente informe en Madrid a treinta de octubre de dos mil seis.

MANUEL CHICHARRO SANTAMARÍA

ESPERANZA BERMEJO BENITO

Vº Bº

EL DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO

Fdo. JESÚS RODRIGUEZ PROCOPIO





*A Carlos, Lucía y mis padres.*



## AGRADECIMIENTOS

Después de tantas horas de trabajo dedicadas a la realización de esta Memoria, donde ha quedado reflejado el esfuerzo y los frutos obtenidos durante mi trayectoria investigadora, no quiero olvidarme de todas aquellas personas que han contribuido de alguna forma, a que este trabajo haya salido adelante y quiero agradecerles sinceramente toda su ayuda:

En primer lugar, al Dr. Manuel Chicharro Santamaría y a la Dra. Esperanza Bermejo Benito por su gran contribución a mi formación científica, sin cuyo trabajo y esfuerzo no hubiera sido posible la realización de esta Memoria. Gracias por darme la oportunidad de conocer el mundo de la investigación, por vuestra confianza y por vuestra preocupación por mí durante todos estos años.

Al Dr. Antonio Zapardiel Palenzuela por su aportación a mi formación científica siendo estudiante y durante mi trayectoria de investigación. Gracias de corazón, por la confianza que siempre has depositado en mí.

Al Dr. Alberto Sánchez Arribas por su ayuda desinteresada y los consejos prestados en la elaboración de esta Memoria, pero sobre todo por su amistad.

A todos los profesores del Departamento de Química Analítica y Análisis Instrumental de la Universidad Autónoma de Madrid.

No me quiero olvidar de todas esas personas que han trabajado con nosotros, y en especial de Cristina que empezó conmigo en esta aventura, me alegro mucho de que hayas encontrado tu camino y de Sara, por su colaboración en la investigación, por su ayuda y por haber estado ahí cuando la he necesitado.

En estos momentos no puedo olvidarme de mis compañeros, M<sup>º</sup> Jesús, Ana, Elena, Rodolfo, Dolores, Mamen y Pilar, para mí más que compañeros, amigos. Gracias a todos por haber estado conmigo en los momentos difíciles y por los gratos momentos pasados.

A mis amigos que por falta de espacio no puedo nombrar, que me han ayudado con su presencia y su ánimo, gracias a todos.

A mi familia que aunque se han quedado para el final, para mí son los primeros. A mi padre y mi madre, quiero agradeceros vuestro apoyo incondicional, cariño, preocupación y esfuerzo para que yo ahora mismo esté donde estoy. Os quiero mucho. A mi hermano, por todo su cariño y ánimo constante, y por recordarme que todo este esfuerzo dará sus frutos. No me puedo olvidar de mis abuelos, pero sobre todo de mi abuelo Pedro José, espero que allí donde estés te sientas muy orgulloso de mí, nunca te olvidaré.

Y por supuesto y sobre todo a Carlos y a Lucía, vosotros habéis sido la fuerza que me ha hecho llegar hasta aquí. Cariño, gracias por tu amor y apoyo incondicional, por escucharme, por no dudar de mí ni un solo segundo y por tantas, tantas cosas...te quiero. Y a tí mi niña, que puedo decirte...eres lo mejor que me ha pasado en la vida.

Por último, recordar el soporte económico prestado para la realización de este trabajo por la Comunidad Autónoma de Madrid y el Ministerio de Educación y Ciencia en forma de proyectos de investigación y a la Universidad Autónoma de Madrid por las becas de tercer ciclo concedidas en el inicio de mis estudios doctorales.

# ÍNDICE



# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 PLAGUICIDAS</b> .....	<b>4</b>
1.1.1 <i>DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN</i> .....	<b>4</b>
1.1.2 <i>EFFECTOS ADVERSOS</i> .....	<b>5</b>
<b>1.2 HERBICIDAS</b> .....	<b>7</b>
1.2.1 <i>CLASIFICACIÓN DE HERBICIDAS</i> .....	<b>7</b>
<b>1.3 AMITROL (3-AMINO-1,2,4-TRIAZOL)</b> .....	<b>12</b>
1.3.1 <i>HISTORIA Y USO ACTUAL</i> .....	<b>13</b>
1.3.2 <i>TRANSPORTE, DISTRIBUCIÓN Y TRANSFERENCIA DE AMITROL AL</i> <i>MEDIOAMBIENTE</i> .....	<b>14</b>
1.3.3 <i>EFFECTOS TOXICOLÓGICOS</i> .....	<b>16</b>
1.3.4 <i>MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE AMITROL</i> .....	<b>16</b>
<b>2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO</b> .....	<b>25</b>
2.1 <b>OBJETIVOS</b> .....	<b>27</b>
2.2 <b>PLAN DE TRABAJO</b> .....	<b>28</b>
<b>3. PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	<b>31</b>
3.1 <b>MATERIALES Y APARATOS</b> .....	<b>33</b>
3.2 <b>REACTIVOS Y DISOLUCIONES</b> .....	<b>36</b>
3.3 <b>PROCEDIMIENTOS</b> .....	<b>38</b>
3.3.1 <i>ELECTROFORESIS CAPILAR</i> .....	<b>38</b>
A. Separación y determinación de amitrol e hidroxiatrazina por electroforesis capilar de zona con detección UV .....	<b>38</b>
B. Separación y determinación de amitrol y urazol por electroforesis capilar de zona con detección dual UV/electroquímica .....	<b>39</b>
3.3.2 <i>ESTUDIOS ELECTROANALÍTICOS DE AMITROL</i> .....	<b>42</b>
A. Estudio electroanalítico de amitrol empleando un electrodo de “glassy carbon” .....	<b>42</b>
B. Estudios electroanalíticos de amitrol en electrodos de pasta de nanotubos de carbono. Voltamperometría de adsorción-redisolución de amitrol .....	<b>43</b>

<b>4. DETERMINACIÓN DE AMITROL POR ELECTROFORESIS CAPILAR</b> .....	<b>45</b>
<b>4.1 SEPARACIÓN Y DETERMINACIÓN DE AMITROL E HIDROXIATRAZINA     POR ELECTROFORESIS CAPILAR DE ZONA CON     DETECCIÓN ULTRAVIOLETA</b> .....	<b>65</b>
<b>4.1.1 ENSAYOS PREVIOS</b> .....	<b>68</b>
A. Elección del modo de electroforesis capilar.....	<b>68</b>
B. Elección de la longitud de onda de medida.....	<b>69</b>
<b>4.1.2 ELECCIÓN DEL ELECTROLITO DE SEPARACIÓN</b> .....	<b>71</b>
A. Influencia del pH. ....	<b>71</b>
B. Influencia de la naturaleza del tampón de separación.....	<b>74</b>
C. Influencia de la concentración.....	<b>75</b>
<b>4.1.3 INFLUENCIA DEL VOLTAJE DE SEPARACIÓN</b> .....	<b>78</b>
<b>4.1.4 ESTUDIOS DE INTRODUCCIÓN DE MUESTRA</b> .....	<b>84</b>
A. Introducción hidrodinámica .....	<b>84</b>
B. Introducción electrocinética.....	<b>90</b>
<b>4.1.5 MODIFICADORES DE FLUJO ELECTROSMÓTICO</b> .....	<b>97</b>
<b>4.1.6 INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE IONES EN LA MUESTRA</b> .....	<b>101</b>
<b>4.1.7 LONGITUD TOTAL Y EFECTIVA DE LA COLUMNA CAPILAR</b> .....	<b>105</b>
<b>4.1.8 ESTUDIO DE LOS PARÁMETROS ANALÍTICOS</b> .....	<b>108</b>
A. Influencia de la concentración de amitrol e hidroxiatrazina .....	<b>108</b>
B. Cálculo del límite de detección.....	<b>110</b>
<b>4.1.9 ESTUDIO DE DEGRADACIÓN DE AMITROL Y ATRAZINA</b> .....	<b>111</b>
<b>4.1.10 DETERMINACIÓN DE AMITROL EN MUESTRAS DE AGUA</b> .....	<b>113</b>
<b>4.2 SEPARACIÓN Y DETERMINACIÓN DE AMITROL Y URAZOL     POR ELECTROFORESIS CAPILAR DE ZONA CON DETECCIÓN DUAL     (UV/AMPEROMÉTRICA)</b> .....	<b>117</b>
<b>4.2.1 DETECCIÓN ELECTROQUÍMICA EN ELECTROFORESIS CAPILAR</b> .....	<b>119</b>
<b>4.2.2 ENSAYOS PREVIOS</b> .....	<b>122</b>
A. Electroactividad de los analitos .....	<b>122</b>
<b>4.2.3 ELECCIÓN DEL ELECTROLITO DE SEPARACIÓN</b> .....	<b>123</b>
A. Influencia del pH y naturaleza del tampón de separación .....	<b>123</b>
B. Influencia de la concentración.....	<b>126</b>
<b>4.2.4 INFLUENCIA DEL VOLTAJE DE SEPARACIÓN</b> .....	<b>129</b>
<b>4.2.5 LONGITUD DE LA COLUMNA CAPILAR</b> .....	<b>131</b>
<b>4.2.6 ESTUDIOS DE INTRODUCCIÓN DE MUESTRA</b> .....	<b>132</b>
<b>4.2.7 OPTIMIZACIÓN DE LA SEÑAL AMPEROMÉTRICA</b> .....	<b>138</b>
<b>4.2.8 ESTUDIO DE LOS PARÁMETROS ANALÍTICOS</b> .....	<b>146</b>



A. Influencia de las concentraciones de amitrol y urazol .....	146
B. Cálculo de los límites de detección y reproducibilidad.....	150
<b>4.2.9 DETERMINACIÓN DE AMITROL Y URAZOL EN PRODUCTOS</b>	
<b>AGROALIMENTARIOS POR DISPERSIÓN DE MATRIZ EN FASE SÓLIDA</b>	
<b>Y ELECTROFORESIS CAPILAR DE ZONA (MSPD-CZE).....</b>	<b>152</b>
A. Cálculo del límite de detección .....	161
<b>4.2.10 DETERMINACIÓN DE AMITROL Y URAZOL EN AGUA</b>	
<b>MINERAL COMERCIAL POR ELECTROFORESIS CAPILAR DE ZONA.....</b>	<b>162</b>
A. Cálculo del límite de detección .....	167
<b>5. ESTUDIOS ELECTROANALÍTICOS DE AMITROL .....</b>	<b>169</b>
<b>5.1 ESTUDIO ELECTROANALÍTICO DE AMITROL EN ELECTRODO</b>	
<b>DE “GLASSY CARBON” .....</b>	<b>173</b>
<b>5.1.1 ENSAYOS PREVIOS.....</b>	<b>175</b>
A. Cálculo del área efectiva de los electrodos de trabajo.....	175
<b>5.1.2 ESTUDIOS EN ELECTRODO ESTÁTICO.....</b>	<b>179</b>
A. Influencia del medio de medida.....	180
A. 1 Influencia del pH .....	180
A. 2 Influencia de la naturaleza del medio .....	184
B. Influencia del potencial inicial y sentido del barrido .....	185
C. Influencia de la velocidad de barrido.....	189
D. Influencia de la concentración .....	193
D. 1. Cálculo de los límites de detección y determinación .....	195
E. Estudios de adsorción en el electrodo.....	195
<b>5.1.3 DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE ELECTRONES .....</b>	<b>198</b>
A. Culombimetría a potencial controlado.....	198
B. Voltamperometría de barrido lineal.....	201
<b>5.1.4 ESTUDIOS EN ELECTRODO ROTATORIO.....</b>	<b>202</b>
A. Cumplimiento de las ecuaciones de Levich y Koutecky-Levich .....	203
B. Influencia de la temperatura en la corriente límite .....	208
C. Influencia de la concentración de amitrol.....	209
<b>5.1.5 MECANISMO ELECTRÓDICO.....</b>	<b>211</b>
A. Reversibilidad.....	211
A. 1 Estudios en régimen no estacionario .....	211
A. 2 Estudios en régimen estacionario .....	213
B. Identificación de los productos de la electrolisis.....	216

B.1 Estudios empleando espectroscopia de absorción infrarroja.....	216
B.2 Identificación y determinación de amonio.....	217
B. 3 Identificación de CO <sub>2</sub> .....	218
C. Propuesta de mecanismo electródico.....	219
<b>5.1.6 DETERMINACIÓN DE AMITROL EN AGUA DE RÍO POR</b>	
<b>VOLTAMPEROMETRÍA DE BARRIDO LINEAL .....</b>	<b>221</b>
A. Influencia de la presencia de dodecil sulfato sódico en el medio de medida sobre la señal anódica de amitrol .....	223
A. 1 Influencia de la concentración del surfactante.....	223
A. 2 Modificación de la superficie del electrodo.....	227
A. 3 Influencia del pH del medio de medida.....	228
A. 4 Elección de la técnica voltamperométrica de medida.....	231
<i>A.4.1. Influencia de la concentración de amitrol por voltamperometria de                 barrido lineal.....</i>	<i>231</i>
<i>A.4.2 Influencia de la concentración de amitrol por voltamperometría                 diferencial de impulsos .....</i>	<i>233</i>
B. Optimización del proceso de preconcentración de amitrol en muestras de agua .....	236
B. 1 Influencia de la concentración del surfactante.....	239
B. 2 Influencia del pH de la muestra.....	239
B. 3 Cálculo de los límites de detección y determinación .....	242
C. Determinación de amitrol en muestras de agua de río .....	244
C.1 Cálculo de los límites de detección y determinación .....	246
<b>5.2 ESTUDIOS ELECTROANALÍTICOS DE AMITROL EN ELECTRODOS</b>	
<b>DE PASTA DE NANOTUBOS CARBONO.</b>	
<b>VOLTAMPEROMETRÍA DE ADSORCIÓN-REDISOLUCIÓN DE AMITROL ..</b>	<b>247</b>
<b>5.2.1 ENSAYOS PREVIOS .....</b>	<b>252</b>
A. Pretratamiento de los electrodos de pasta de nanotubos de carbono.....	252
<b>5.2.2 ELECCIÓN DEL MEDIO DE MEDIDA .....</b>	<b>257</b>
A. Elección del pH.....	257
B. Influencia de la concentración.....	258
<b>5.2.3 INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE AMITROL .....</b>	<b>260</b>
A. Estudio empleando “ <i>multi wall carbon nanotubes</i> ” cortos .....	260
B. Estudio empleando “ <i>multi wall carbon nanotubes</i> ” largos .....	262
<b>5.2.4 ADSORCIÓN DE AMITROL EN ELECTRODOS DE PASTA DE</b>	
<b>NANOTUBOS DE CARBONO PRETRATADOS .....</b>	<b>263</b>
<b>5.2.5 CONDICIONES ÓPTIMAS DE PRECONCENTRACIÓN.....</b>	<b>265</b>
A. Influencia del pH.....	265

B. Influencia de la concentración .....	266
C. Influencia del tiempo de preconcentración.....	267
D. Influencia del potencial de preconcentración .....	269
5.2.6 <i>INFLUENCIA DEL TIEMPO DE EQUILIBRADO</i> .....	271
5.2.7 <i>INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE AMITROL</i> .....	273
A. Cálculo de los límites de detección y determinación.....	274
5.2.8 <i>REPETITIVIDAD DEL ANÁLISIS</i> .....	275
5.2.9 <i>ESTABILIDAD DE LOS ELECTRODOS</i> .....	276
5.2.10 <i>ESTUDIO DE INTERFERENCIAS</i> .....	277
5.2.11 <i>DETERMINACIÓN DE AMITROL EN MUESTRAS DE AGUA</i> .....	278
6. <b>CONCLUSIONES</b> .....	281
7. <b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	289
8. <b>PUBLICACIONES DERIVADAS</b> .....	305



# **1. INTRODUCCIÓN**



## 1. INTRODUCCIÓN

El análisis de “microcontaminantes orgánicos” en muestras de interés medioambiental, es uno de los retos más importantes que actualmente tiene planteados la Química Analítica.

Dentro del nombre genérico de “microcontaminantes orgánicos” se encuentran una serie de compuestos que a bajos niveles de concentración, pueden ejercer efectos adversos sobre los organismos vivos y su medio, debiéndose fundamentalmente su peligrosidad a dos de sus principales características: persistencia en el medio y poder de acumulación a lo largo de la cadena trófica.

La presencia de estos “microcontaminantes orgánicos” en el medio se ha incrementado en las últimas décadas a través de diferentes fuentes de contaminación, siendo su origen fundamental, de tipo antropogénico. La presencia de estos compuestos se debe principalmente a las siguientes actividades:

- Prácticas agropecuarias (uso de plaguicidas, fertilizantes, etc....),
- Actividades de origen urbano y vertederos de residuos sólidos, y
- Actividades del sector industrial, en el que se utilizan un gran número de compuestos orgánicos (disolventes, desengrasantes, pigmentos, conservantes, agentes de limpieza, etc....).

Entre los distintos tipos de “microcontaminantes orgánicos” presentes en el medio, se encuentran los plaguicidas.

La producción y el uso de plaguicidas han experimentado un gran aumento durante las últimas décadas. El uso de estos compuestos orgánicos, resulta imprescindible para mantener el nivel y la calidad de la producción agrícola actual. Sin embargo, este hecho ha dado lugar a la aparición de residuos de plaguicidas en alimentos y en el medioambiente, lo que constituye un riesgo potencial tanto para la salud humana como para el medioambiente en general, dada su naturaleza biocida. Es por ello que resulta necesario disponer de métodos analíticos fiables y suficientemente sensibles que permitan su control en los diversos tipos de muestras medioambientales.

## 1.1 PLAGUICIDAS

### 1.1.1 DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación junto con la Organización Mundial de la Salud (FAO/OMS) definen el término plaguicida como<sup>1</sup>:

*“Cualquier sustancia destinada a prevenir, destruir, atraer, repeler o combatir cualquier plaga, incluidas las especies indeseadas de plantas o animales, durante la producción, almacenamiento, transporte, distribución y elaboración de alimentos, productos agrícolas o alimentos para animales, o que pueda administrarse a los animales para combatir ectoparásitos. El término incluye las sustancias destinadas a utilizarse como reguladoras del crecimiento de las plantas, defoliantes, desecantes, agentes para reducir la densidad de fruta o inhibidores de la germinación, y las sustancias aplicadas a los cultivos antes o después de la cosecha para proteger el producto contra su deterioro durante el almacenamiento y transporte”.*

Realizar una clasificación de los plaguicidas es bastante complicado, debido al elevado número de compuestos existentes con características físicas y químicas diferentes y complejas. La mayor parte de las veces, el plaguicida (sustancia activa) es aplicado sobre los cultivos, combinado con otros plaguicidas y/u otros ingredientes inertes, con el objetivo de aumentar su rendimiento dando lugar a los llamados “plaguicidas sintéticos”. Actualmente se cuenta con una amplia oferta de mezclas comerciales con muy diferentes usos y aplicaciones<sup>2</sup>.

Dentro de la familia de plaguicidas podemos diferenciar:

- **Acaricidas**, combaten diferentes tipos de ácaros, araña roja, etc.
- **Algicidas**, usados para el control de algas en lagos, canales, piscinas y depósitos de agua.
- **Repelentes**, actúan alejando los insectos dañinos.
- **Atrayentes**, sustancias que conducen a un insecto o un roedor a una trampa.
- **Desinfectantes de suelos**, se utilizan para el control de microorganismos productores de enfermedades.
- **Fungicidas**, también conocidos como agentes anticriptogámicos. Actúan contra los hongos parásitos causantes de enfermedades en los cultivos.



- **Herbicidas**, combaten las malas hierbas, de un modo general o selectivo (dejando indemne el cultivo y destruyendo todas o buena parte de las hierbas adventicias).
- **Insecticidas**, combaten los insectos (pulgonos, minadores, taladradores, chupadores, cochinillas, etc.).
- **Molusquicidas**, destinados a exterminar caracoles y babosas.
- **Nematicidas**, se usan contra nemátodos que se alimentan de las raíces de las plantas.
- **Rodenticidas**, utilizados en el control de ratones y otros roedores.
- **Antibióticos de uso agrícola**, combaten las bacteriosis propias de todos los cultivos.

### **1.1.2 EFECTOS ADVERSOS DE LOS PLAGUICIDAS**

Hoy en día, el uso de los plaguicidas ha permitido el incremento en la producción de alimentos y mejoras en la salud humana, ya que sin ellos, los daños producidos por plagas y enfermedades serían catastróficos. Sin embargo, también es preciso reconocer que cada vez es mayor la inquietud de la sociedad por la presencia de estos residuos en el medio, y los efectos adversos que ello conlleva.

Como ya se ha mencionado, los plaguicidas son biocidas y, por lo tanto, sustancias tóxicas y peligrosas. Esta peligrosidad presenta varios aspectos: peligrosidad en su fabricación y formulación, peligrosidad para el aplicador que puede entrar en contacto directo con él al realizar el tratamiento, peligrosidad ecológica, es decir, su acción sobre el medioambiente con secuela de efectos secundarios indeseables (desequilibrios biológicos, aparición de nuevas plagas, resistencias, fototoxicidades, acción sobre la fauna silvestre terrestre y acuícola, toxicidad para abejas, etc.) y por último, peligrosidad para el consumidor de los productos agrícolas tratados, a causa de los residuos tóxicos que los alimentos pudieran contener.

Aunque todos los aspectos de la peligrosidad son importantes, la presencia de residuos de plaguicidas en alimentos y aguas es lo que más preocupa a la opinión pública, y como consecuencia, a las Administraciones Públicas de los distintos países así como a los Organismos Internacionales (FAO, CEE...), dado que afecta directamente a la salud de la población<sup>3,4</sup>.

En la mayor parte de los países, las autoridades han dictado una serie de normas con el fin de proteger la salud de los consumidores. Estas normas son muy variadas y van desde

ciertas obligaciones formales de homologación y registro, incluyendo la fijación de “límites máximos de residuos” (LMRs), a la prohibición pura y simple del uso de ciertos plaguicidas, pasando por los más diversos tipos de restricciones y limitaciones de uso. En general, con estas normas, se pretende hacer compatible la protección de la Salud Pública con la defensa sanitaria de los cultivos.

Para que la comercialización de una sustancia activa pueda ser autorizada a nivel europeo, según marca la directiva relativa a la comercialización de productos fitosanitarios (91/414/CEE)<sup>5</sup>, se exige la realización de un informe de evaluación de la sustancia. Además de conocer la “Ingesta Diaria Admisible” (IDA) y el nivel de exposición para el usuario, este informe requiere numerosa documentación, incluyendo el conocimiento de los métodos analíticos (con porcentaje de recuperación y límite de detección sobre diversas matrices)<sup>3</sup>.

Dentro del campo de la Química Analítica, toda esta problemática, ha generado la necesidad de desarrollar nuevas metodologías analíticas que permitan el seguimiento, detección y determinación de residuos de plaguicidas en aguas y alimentos a bajos niveles de concentración.

El objetivo de esta Memoria es el desarrollo de nuevos métodos analíticos para la determinación del herbicida denominado amitrol, y la aplicación de éstos a su detección y determinación en muestras de agua y alimentos.

## 1.2 HERBICIDAS

Los herbicidas son productos destinados a destruir malas hierbas (plantas adventicias), que entorpecen el libre desarrollo de los cultivos y cuyos daños pueden resumirse como sigue<sup>1</sup>:

- Compiten con el cultivo al beneficiarse de alimentos que debieran ser aprovechados por aquel, y como consecuencia el cultivo se desarrolla mal y rinde poco. Si las malas hierbas crecen en exceso, disminuyen la luz solar y perjudican al cultivo.
- Hay contaminación por semillas de malas hierbas en la cosecha de granos y tubérculos, disminuyendo e incluso anulando su valor para siembra posterior o venta directa.
- Dificultan las labores habituales de los cultivos.
- Son huéspedes temporales de plagas y enfermedades que pasan luego a los cultivos.

Los herbicidas se emplean en zonas que deben mantenerse libres de vegetación con el fin de aumentar la visibilidad, seguridad personal y evitar incendios, tales como carreteras, vías férreas, zonas públicas, alrededores de zonas industriales, etc....

Actualmente, el uso de herbicidas está totalmente aceptado y extendido en la agricultura de los países desarrollados. En España, por ejemplo, están registrados unas 130 sustancias activas (“herbicidas simples”) y más de 750 herbicidas comerciales (diversas formulaciones y combinaciones de herbicidas simples). Sus características agronómicas y toxicológicas varían mucho según el compuesto de que se trate.

### 1.2.1 CLASIFICACIÓN DE HERBICIDAS

Independientemente de su composición química, los herbicidas se clasifican de diversas formas atendiendo a<sup>1</sup>:

- **Fin perseguido:** Herbicidas totales o selectivos.
- **Modo de actuación:** Herbicidas residuales, de actuación por contacto y sistémicos.
- **Momento de la aplicación:** Herbicidas de presembrado o preplantación, de pre-emergencia y de postemergencia.

El Comité de Prevención de Resistencias a Herbicidas (CPRH) ha clasificado a los herbicidas alfabéticamente según los modos y puntos de acción, la semejanza en los síntomas inducidos y por familias químicas. En la tabla 1 se muestra esta clasificación.

Tabla 1.- Clasificación de los Herbicidas<sup>2</sup>

GRUPO	MODO DE ACCIÓN	FAMILIA QUÍMICA	MATERIA ACTIVA
A	Inhibición de la acetil coenzima carboxilasa (ACCase)	Aryloxfenoxi-propionatos	Clodinafop-propargil, butil-cihalofop, metil-diclofop, etil-P-fenoxaprop, butil-P-fluazifop, metil-R-Haloxip, propaquizafop, etil-P-quizalofop
		Cyclohexano-dionas	Cletodim, cloxidim, tralkoxidim
B	Inhibición de la acetolactato sintetasa (ALS)	Sulfanilureas	Amidosulfuron, azimsulfuron, metil-bensulfuron, clorsulfuron, cinosulfuron, etoxisulfuron,, flazasulfuron, imazosulfuron, iodosulfuron, mesosulfuron, metil-metsulfuron, nicosulfuron, oxasulfuron, prosulfuron, sulfosulfuron, metil-tiasulfuron, triasulfuron, metil-trivenuron, metil-triasulfuron
		Imidazolinonas	Metil-imazametabenz, imazamox, imazaquin
		Triazolpirimidinas	Metil-cloransulam, diclosulam, flumetsulam, metosulam
		Pirimidinil tiobenzosatos	Bispiribac, piribenzoxim, perithiobac-na, metil-priminobac
C <sub>1</sub>	Inhibición de la fotosíntesis en el fotosistema II	Triazinas	Ametrina, atrazina, cianazina, desmetrina, prometrina, propazina, simazina, terbumetona, terbutilazina, terbutrina
		Triazonas	Hexazinona, metamitrona, metribuzina
		Urazilos	lenacilo, terbacilo
		Piridazinona	Pirazona = cloridazona
		Fenil-carbamatos	Desmedifam, fenmedifam
C <sub>2</sub>	Inhibición de la fotosíntesis en el fotosistema II	Ureas	Clortoluron, diuron, fluometuron (ver F <sub>3</sub> ), isoproturon, linuron, metabenziazuron, etobromuron
		Amida	Propanil
C <sub>3</sub>	Inhibición de la fotosíntesis en el fotosistema II	Benzonitrilos	Bromoxinil (también en grupo M), ioxinil (también en grupo M)
		Benzotiadiazol	Bentazona
		Fenil-piridazina	Piridato

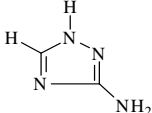
GRUPO	MODO DE ACCIÓN	FAMILIA QUÍMICA	MATERIA ACTIVA
D	Desviación del flujo electrónico en el fotosistema	Bipiridilos	Dicuat, paracuat
E	Inhibición de la protoporfirinógeno oxidasa (PPO)	Difeniléteres	Acifluorfen-Na, aclonifen, bifenox, etil-fluoroglicofen, fomesafen, oxifluorfen
		N-fenil-ítalimidas	Flumioxazin
		Tiadiazoles	Tidiazimina
		Oxadiazol	Oxadiazon
F <sub>1</sub>	Decoloración: inhibición de la síntesis de los carotenoides a nivel de la fitoeno desaturasa (PDS)	Triazolinona	Carfentrazona, sufentrazona
		Nicotiananlida	Diflufenican
F <sub>2</sub>	Decoloración: inhibición de la 4-hidroxifenil-piruvato-dioxigenasa (4-HPPD)	Otros	Fluridona, flurocloridona, flurtamone
		Triketona	Sulcotriona
		Ixosazol	Isoxaflutol
F <sub>3</sub>	Decoloración: inhibición de la síntesis de los carotenoides (punto desconocido)	Pirazol	Pirzazolinato, pirazoxifen
		Isoxazolidiona	Clomazona
		Urea	Fluometuron (ver C <sub>2</sub> )
G	Inhibición de la EPSP sintetasa	Triazol	Amitrol
G	Inhibición de la EPSP sintetasa	Glicinas	Fliosato, sulfosato
H	Inhibición de la glutamino sintetasa	Ácido fosfórico	Flufosinato-amonio, bialafos = bilanafos
I	Inhición del dihidropteroatosintetasa	Carbamato	Asulam
K <sub>1</sub>	Inhibición de la unión de los microtúbulos en la mitosis	Dinitroanilinas	Benefin=benfluralina, etalfluralina, pendimetalina, trifluralina
		Fosforoamidatos	Metl-amiprofos
		Piridazdina	Ditiopir, tiazopir
		Acido benzoico	D CPA = clortal

GRUPO	MODO DE ACCIÓN	FAMILIA QUÍMICA	MATERIA ACTIVA
K <sub>2</sub>	Inhibición de la mitosis	Carbamatos	Clorprofam
K <sub>3</sub>	Inhibición de la división celular	Cloroacetamidas	Acetacloro, atacloro, butacloro, dimetenamida, metazacloro, metolacloro, propacloro
		Carbamato	Carbetamida
		Acetamida	Napropamida
		Benzamida	Propizamida = pronamida
L	Inhibición de la síntesis de la pared celular (celulosa)	Benzonitrilos	Diclobenil, clortiamida
		Benzamida	Isoxaben
N	Inhibición de la síntesis de los lípidos (no ACCasa)	Tiocarbamatos	Molinato, prosulfocarb, tiobencarb=bentiocarb, trialato
		Benzofurano	Etofumesato
O	Auxinas sintéticas (como la acción del ácido indolacético AIA)	Ácidos fenoxi-carboxílicos	2,4-D, 2,4-DB, diclorprop, 2,4-DP, MCPA, MCPB, mecoprop, MCPP
		Ácido benzoico	Dicamba
		Ácidos picolinico	Clopivalida, fluroxipir, picloram, triclopir
		Ácidos quinolin carboxílicos	Quinclorac, quinmerac
P	Inhibición del AIA	Ftalamato diflufenzopir	Naptalam
Z	Desconocido	Acido arilamino propionico y otros	Metil-flamprop/-isopropil Flurenol, difenzocuat, dazomet, metam, ácido pelargónico.

### 1.3 AMITROL (3-AMINO-1,2,4-TRIAZOL)

El amitrol (3-amino-1,2,4-triazol), pertenece a la familia de los triazoles, es un herbicida sistémico, es absorbido fácilmente por las hojas y traslocado a toda la planta. Dentro de la clasificación del CPRH, pertenece al grupo F<sub>3</sub>, cuyo principal punto de acción es la interferencia en la biosíntesis de los carotenoides. En ausencia de carotenoides, la clorofila de las hojas de las plantas se destruye por foto-oxidación dando lugar a los síntomas característicos de la clorosis.

Tabla 2. Características del amitrol<sup>6</sup>

<b>Nombre común</b>	Amitrol
<b>Nombre químico</b>	3-amino-1,2,4-triazol 
<b>Fórmula empírica</b>	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> N <sub>4</sub>
<b>Peso molecular</b>	84.08
<b>CAS</b>	61-82-5
<b>Punto fusión</b>	157-159 °C
<b>Apariencia</b>	Polvo incoloro cristalino
<b>Solubilidad en agua</b>	280 g L <sup>-1</sup> a 23°C
<b>Solubilidad en otros disolventes</b>	Cloruro de metileno: 11 mg L <sup>-1</sup> Hexano: 1 mg L <sup>-1</sup>
<b>Presión vapor</b>	4,4 x 10 <sup>-7</sup> mm Hg
<b>Log K<sub>ow</sub></b>	-0,15
<b>Constante Henry</b>	1.76 x 10 <sup>-8</sup> Pa m <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup> a 20°C
<b>Constantes de disociación</b>	pK <sub>1</sub> 1.6 pK <sub>2</sub> 4.2 pK <sub>3</sub> 10.5



### 1.3.1 HISTORIA Y USO ACTUAL

El amitrol fue registrado en 1954 como herbicida para el control de malas hierbas en diversos lugares terrestres y acuáticos. En 1958 se registró como herbicida de post-emergencia en cultivos de arándanos, provocando la llamada “crisis del arándano” en 1959<sup>7</sup>. Un mal uso del herbicida dio lugar a la aparición de sus residuos en las cosechas posteriores a su aplicación, provocando la pérdida de las mismas. Este acontecimiento trajo consigo la primera aplicación de la *Cláusula de Delaney (1958)*<sup>8</sup>, en la cual se prohíbe cualquier cantidad de sustancia cancerígena en alimentos y obligó a los agricultores a leer y seguir las instrucciones de las etiquetas de los plaguicidas más cuidadosamente.

Fue en 1971, cuando se comprueba experimentalmente el potencial cancerígeno del amitrol en animales, cuando la EPA (US Environmental Protection Agency) lo clasifica como herbicida de uso restrictivo (RU), cancelando su uso en cultivos alimenticios<sup>9</sup>.

En el año 2001, de acuerdo a lo establecido por la Directiva 91/414/CEE, relativa a la comercialización de productos fitosanitarios y previa elaboración del informe de evaluación del herbicida, se acepta la inclusión del amitrol en el anexo I de dicha Directiva<sup>10</sup>, autorizándose, su uso como herbicida, siempre y cuando se cumplan una serie de normas de utilización.

Actualmente, el amitrol se usa para el control de malas hierbas perennes y anuales, en áreas que deben mantenerse libres de vegetación como pueden ser carreteras, vías férreas, zonas públicas, y alrededor de zonas industriales como estaciones eléctricas, torres de transmisión eléctrica y otras, con el fin de aumentar la visibilidad, seguridad personal y la prevención de incendios. Se emplea también en cultivos de vid, olivo, frutales de pepita, cítricos y avellanos, además de en terrenos de barbecho evitando siempre el contacto directo con los productos alimenticios. También se está usando con éxito en pantanos y zanjas de drenaje que deben mantenerse libres de hierbas acuáticas<sup>2</sup>.

En España, se comercializan diferentes formulaciones con amitrol<sup>2</sup>. La mayoría de los preparados son mezcla de amitrol con tiocianato amónico y/o con otros herbicidas residuales como el diurón, el ácido 2-metil-4-clorofenoxiacético (MCPA), la simazina y la N-(fosfometil)glicina, (glifosato), tanto para mejorar su acción como para conseguir un efecto residual que el amitrol solo no tiene<sup>1</sup>.

### 1.3.2 TRANSPORTE, DISTRIBUCIÓN Y TRANSFERENCIA DE AMITROL EN EL MEDIOAMBIENTE

Cuando se aplica un plaguicida en una planta, se produce un depósito sobre ella del cual solo un porcentaje será asimilado por ésta, y el resto será transportado y distribuido en el medioambiente en función de una gran variedad de factores: naturaleza del plaguicida y de la formulación, características de la aplicación, condiciones meteorológicas, etc<sup>3</sup>.

En la figura 1 se muestra un resumen esquemático de la movilidad de los plaguicidas en el medioambiente y sus posibles destinos.

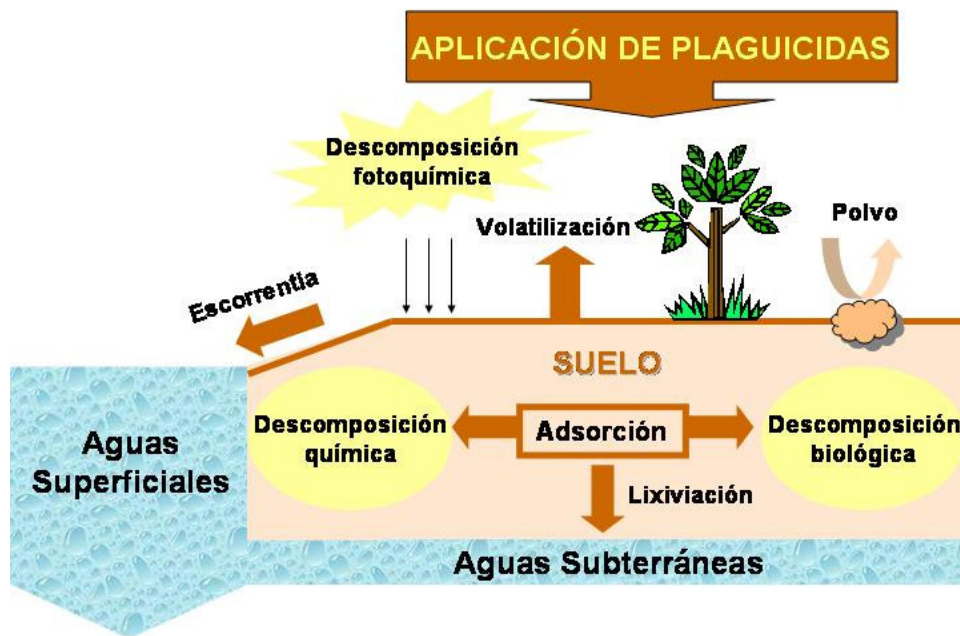


Figura 1.- Movilidad de los plaguicidas<sup>11</sup>

El comportamiento del plaguicida en el medio determinará su persistencia en éste y por lo tanto su potencial contaminante.

Se han realizado diversos estudios del comportamiento del amitrol en suelos y agua con el objetivo de evaluar su potencial contaminante sobre éstos. Su distribución a través del aire es mínima e incluso se puede decir que nula teniendo en cuenta su baja presión de vapor ( $4.4 \times 10^{-7}$  mm Hg)<sup>6</sup>.

La bibliografía muestra ciertas discrepancias en cuanto a la adsorción del amitrol al suelo. Por una parte, **Sund**<sup>12</sup> apunta a una fuerte adsorción del herbicida al suelo, mientras que **Nearpass**<sup>13</sup> habla de una adsorción débil y reversible del compuesto en el suelo.

**Anderson y Hellpointner**<sup>6</sup> en base a los valores del coeficiente de reparto n-octanol/agua que obtienen en diferentes tipos de suelos, clasifican al amitrol como “muy móvil” en suelos de pH mayor de 5 y “moderadamente móvil” en suelos de pH inferior a 5.

A partir de estudios realizados en columnas preparadas con diferentes tipos de suelos, se puede decir que la movilidad del amitrol es mayor en suelos arenosos y que se reduce al aumentar el contenido de materia orgánica de éstos<sup>6,14</sup>. Estudios más recientes<sup>15</sup> concluyen que la movilidad del amitrol es baja en presencia y ausencia de materia orgánica, pero que en condiciones anaeróbicas el transporte se incrementa con el incremento de materia orgánica.

La mayoría de los estudios realizados de degradación de amitrol en suelos, apuntan a una degradación rápida del herbicida a CO<sub>2</sub>, principalmente por vía microbiana<sup>15-18</sup> aunque también se ha propuesto su degradación por mecanismos abióticos<sup>19-20</sup>.

La EPA ha realizado un informe de evaluación del amitrol<sup>21</sup>. En dicho informe, se clasifica al herbicida de ligero a moderadamente persistente en el suelo. Establece que la vida media de amitrol bajo condiciones aeróbicas es de 22-26 días en suelos y 57 días en sedimentos, aumentando su valor con el aumento de la temperatura. Bajo condiciones anaeróbicas, la vida media del herbicida es mayor de 1 año.

Por otro lado, se ha estudiado la estabilidad del amitrol en medio acuoso. Para ello se han realizado estudios de fotodegradación bajo diferentes condiciones. Por lo general el periodo de semifotodegradación del amitrol en el agua es próximo o mayor de un año en función del pH<sup>6,21,22</sup>. Este periodo de semifotodegradación se ve disminuido a 7.5 horas en presencia de la sal potásica del ácido húmico, que es fotosensibilizadora<sup>23</sup>.

A la vista de todo lo anterior, es evidente que el amitrol puede ser considerado como un posible contaminante de aguas, teniendo en cuenta que su persistencia y movilidad en el suelo es variable en función del tipo de suelo y condiciones de éste, y su alta solubilidad y estabilidad en el medio acuoso.

### **1.3.3 EFECTOS TOXICOLÓGICOS DEL AMITROL**

El amitrol está considerado como un compuesto de toxicidad aguda baja, en seres humanos y otros animales, puesto que no se ha demostrado que sea peligroso para los trabajadores expuestos a él, incluso después de una exposición a tiempo prolongado<sup>24</sup>. Lo que sí se ha comprobado y demostrado es que induce la formación de tumores en el hígado y tiroides en animales de laboratorio<sup>6,21,24-26</sup>. Debido a esta clara evidencia de su efecto cancerígeno en animales pero no en seres humanos, la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC) lo ha clasificado como agente cancerígeno de categoría 3<sup>27</sup>. Se tienen pruebas que confirman su capacidad efectiva o potencial de causar alteraciones endocrinas (disruptor endocrino)<sup>28,29</sup>. Los disruptores endocrinos, son sustancias químicas capaces de alterar el sistema hormonal y ocasionar diferentes daños sobre la salud de mujeres y hombres expuestos, así como de sus descendientes. También afectan a la reproducción y salud de otras especies animales debido a la contaminación ambiental. Los efectos de los disruptores endocrinos se producen generalmente a dosis muy bajas, en general muy por debajo de los límites de exposición legalmente establecidos.

Dada la toxicidad que presenta el amitrol y teniendo en cuenta el uso de éste que se realiza hoy en día, queda patente la importancia del desarrollo de metodologías analíticas sensibles que permitan su detección y determinación en el medioambiente a bajos niveles de concentración.

### **1.3.4 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE AMITROL**

Hasta el momento, se han desarrollado diferentes métodos analíticos para la detección y determinación de amitrol. Estos métodos han sido, en algunos casos, aplicados en muy diversas matrices, como son: plantas, suelo, formulaciones comerciales, orina, alimentos y principalmente agua.

Los primeros métodos analíticos descritos para el análisis de amitrol, emplean cromatografía en papel y espectroscopía de absorción molecular para la detección y determinación del herbicida en distintas matrices. Todos ellos están basados en la diazotación del grupo amino seguida de una reacción de copulación, para dar lugar a un complejo coloreado. Entre los reactivos empleados en esta reacción de copulación están: el ácido cromotrópico<sup>30</sup>, fenol en medio ácido clorhídrico 20%<sup>31</sup>, N-(1-naftil)etilendiamina<sup>32-34</sup> y el ácido 8-amino-1-naftol-3,6 disulfónico<sup>36,37</sup>.

También, se han desarrollado diversas metodologías analíticas utilizando diferentes técnicas de separación. Se han empleado las técnicas cromatográficas: especialmente la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) en diferentes modos (par iónico, intercambio catiónico, fase inversa) y la electroforesis capilar.

La cromatografía de gases ha sido, en general, muy poco empleada en el análisis de amitrol, debido a la alta polaridad y baja volatilidad del herbicida. Utilizando esta técnica se han puesto a punto varios métodos de detección y determinación de amitrol en formulaciones comerciales<sup>37</sup>, agua<sup>38</sup>, tejidos vegetales, suelo<sup>39</sup> y orina<sup>40</sup>.

**Van der Poll y col.** emplean la cromatografía de gases acoplada a un detector de ionización de llama (FID), dopada con sales alcalinas para la determinación de amitrol en aguas, tejido vegetal y suelos<sup>38,39</sup>. En el método desarrollado para el análisis de amitrol en agua, la muestra previamente es evaporada y derivatizada (acetilación) alcanzándose un límite de detección de  $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$ , con recuperaciones del 97%<sup>38</sup>. En la determinación del herbicida en tejido vegetal y suelos, éste es previamente extraído con etanol y adsorbido en una resina de intercambio catiónico (Amberlite IR-120 (H+), se extrae de ésta con amonio, se derivatiza (acetilación) y se hace pasar a través de un cartucho de sílica. El eluato se preconcentra y se analiza. El límite de detección obtenido en ambas matrices es de  $0.01 \text{ mg Kg}^{-1}$ , con recuperaciones del 81% en el tejido vegetal y 96% en el suelo<sup>39</sup>.

A finales del siglo pasado, **Lewalter y col.** desarrollan un método para la determinación del herbicida en orina, utilizando la cromatografía de gases acoplada a un detector nitrógeno-fósforo (NPD), alcanzando un límite de detección de  $200 \mu\text{g L}^{-1}$ . Para ello previamente acetilan la muestra, posteriormente realizan una extracción líquido-líquido, evaporan a sequedad, redisuelven en una mezcla de acetato butílico y eter diisopropílico y finalmente inyectan en el sistema cromatográfico<sup>40</sup>.

Existe abundante bibliografía referida a la detección y determinación de amitrol empleando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplada a diferentes técnicas de detección: espectroscópicas (absorción molecular en el UV-Visible, fluorescencia molecular), espectrometría de masas y electroquímicas (amperometría). Por ello, se han resumido todos los trabajos publicados hasta el momento, en la tabla 3, donde los métodos desarrollados se ordenan cronológicamente, junto con su aplicación (en caso de que se haya estudiado).

Tabla 3.- Métodos de determinación de amitrol por HPLC

Separación HPLC	Detección	Límite de detección del método	Aplicación Tratamiento de muestra	Aplicación L. Detección	Referencia
Par iónico	Espectrofotométrica (546 nm)	No mostrado	<b>Patatas y Remolacha</b> Extracción: Etanol; Derivatización: Diazotación y reacción con ácido 8-amino-1naftol-3,6 disulfónico Limpieza: columna cromatográfica de poliamida	0.005-0.01 mg Kg <sup>-1</sup>	41
Par iónico	Espectrofotométrica (440nm)	No mostrado	<b>Orina</b> <b>Derivatización:</b> Diazotación y reacción con ácido 8-amino-1naftol-3,6 disulfónico.	0.2 mg L <sup>-1</sup>	42
Fase inversa	Electroquímica	No mostrado	<b>Órganos de animales</b> <b>Extracción: metanol</b> <b>Limpieza:</b> Cromatografía de geles	0.06 mg kg <sup>-1</sup>	43
Fase inversa	Floorescencia	No mostrado	<b>Moras</b>	< 3.8 mg Kg <sup>-1</sup>	44
Fase inversa	Fluorescencia	No mostrado	<b>Agua</b> Derivatización: Fluorescamina	50 ng L <sup>-1</sup>	45
Par iónico	Electroquímica	0.1 ng (250 µL)	<b>Agua de grifo</b> Preconcentración: Evaporación	0.1 µg L <sup>-1</sup>	46
Fase inversa	Electroquímica	No mostrado	<b>Agua de grifo</b> Preconcentración: Evaporación	0.05 µg L <sup>-1</sup>	47
Par iónico	UV	50 ng (100 µL)	No estudiada	No estudiada	48
	Electroquímica	0.1 ng (100 µL)	<b>Agua grado LC y Agua de grifo</b> Preconcentración: Evaporación	Agua grado LC < 0.1 µg L <sup>-1</sup> Agua de grifo > 0.1 µg L <sup>-1</sup>	

Separación HPLC	Detección	Límite de detección del método	Aplicación Tratamiento de muestra	Aplicación Límite de detección	Referencia
Par iónico	Electroquímica	200 pg (5µ L)	<b>Formulaciones comerciales</b>	200 pg (5µL)	49
	UV (200 nm)	2.5 ng (5µ L)		2.5 ng (5µL)	
Fase inversa	UV	2 ng (20 µL)	<b>Agua potable</b> Preconcentración: Evaporación	0.15 µg L <sup>-1</sup>	50
	Electroquímica	0.6 ng (20 µL)	<b>Agua potable</b> Preconcentración: Evaporación	0.1 µg L <sup>-1</sup>	
Intercambio catiónico	Electroquímica	0.3 ng (20 µL)	<b>Agua potable</b> Preconcentración: Evaporación	< 0.1 µg L <sup>-1</sup>	50
			<b>Agua potable</b> Preconcentración: Extracción en fase sólida (SPE)	> 0.1 µg L <sup>-1</sup>	
No mostrado	Electroquímica	No mostrado	<b>Agua</b> Limpieza y preconcentración: columna de intercambio iónico.	0.6 µg L <sup>-1</sup>	51
Fase inversa	Fluorescencia	4.8 ng (20 µL)	<b>Agua de grifo</b> Derivatización: Fluorescamina. Filtrado: Extracción en fase sólida (SPE)	7.5 ng (20µL)	52
Fase inversa	Masas	0.017 µg L <sup>-1</sup>	<b>Agua potable</b> <b>Agua superficial</b> Derivatización: 9-fluorometil cloroformato (FMOC) Preconcentración: En línea con SPE	< 0.025 µg L <sup>-1</sup>	53

Separación HPLC	Detección	Límite de detección del método	Aplicación Tratamiento de muestra	Aplicación L. Detección	Referencia
No mostrado	Fluorescencia	No mostrado	Agua pura Agua de río Agua de mar Derivatización: fluorescamina	No mostrado	54
Fase inversa	Masas	0.001 µg L <sup>-1</sup>	Agua río Lixiviado vertedero	Agua río: 0.004 µg L <sup>-1</sup> Lixiviado vertedero: 0.6 µg L <sup>-1</sup>	55
Fase normal	Masas-Masas	1.6 ng (20µL)	No estudiada	No estudiada	56



Para la detección y determinación de amitrol por HPLC se han utilizado diversas técnicas de detección (Tabla 3). Se han empleado: espectroscopía UV-Visible, espectroscopía de fluorescencia molecular, espectrometría de masas y electroquímica. La detección electroquímica presenta numerosas ventajas en la detección de amitrol, a la vista de los límites de detección alcanzados en las metodologías que emplean éste tipo de detección. Además no es necesaria una derivatización previa del herbicida. En la mayor parte de los métodos puestos a punto para la determinación de amitrol por HPLC con detección electroquímica, la detección se realiza amperométricamente y trabajando en oxidación, empleando como electrodo de trabajo un electrodo de “*glassy carbon*”. Únicamente **Bernwieser y col.**<sup>47</sup> emplean la detección coulombimétrica utilizando un “*array*” de electrodos, pudiendo medir a potenciales menores y obteniendo por tanto una mejor selectividad.

En algunos de estos trabajos de análisis de amitrol por HPLC<sup>48,50</sup>, se ha comparado la detección UV con la electroquímica, alcanzándose límites de detección menores con esta última (Tabla 3).

La electroforesis capilar (CE) a pesar de sus ventajosas características, como la elevada eficacia de separación, la rapidez de sus separaciones, la simplicidad de la puesta a punto de los métodos de separación, su bajo coste derivado del escaso consumo de muestras y reactivos, escasez de residuos generados y su fácil automatización; y su elevada aplicación durante los últimos años en el análisis de pesticidas<sup>57</sup>, no ha sido demasiado empleada para el análisis y control de amitrol. Con excepción de lo desarrollado en este trabajo de Tesis Doctoral, solo pueden encontrarse en la bibliografía cuatro trabajos más.

El primero de ellos es desarrollado por **Weschler y col.**<sup>58</sup>. En él se emplea tanto la electroforesis capilar de zona (CZE) como la cromatografía electrocinética capilar micelar (MEKC), con detección UV, para separar amitrol, flusilazol y flutriazol, alcanzando un límite de detección para el amitrol de 10 mg L<sup>-1</sup>.

Posteriormente, **Cho**<sup>59</sup> propone un método para la determinación de amitrol en productos agrícolas por electroforesis capilar de zona (CZE) con detección UV.

En 2002, **Chicharro y col.**<sup>60</sup> emplean MEKC con detección dual UV-amperométrica para la separación y detección de amitrol, asulam, simazina y diuron.

Y por último, **Takeda y col.**<sup>61</sup>, utilizan la electroforesis capilar acoplada a un detector de masas para la preconcentración en línea y separación de cinco pesticidas: amitrol, carbendazim, 2-aminobenzimidazol, thiabendazol y 1,2-diaminobenceno, empleando un tampón de separación volátil. El límite de detección alcanzado para el amitrol es  $0.13 \text{ mg L}^{-1}$ .

En las metodologías puestas a punto para el análisis de amitrol por electroforesis capilar, la detección UV-Visible se ha empleado en dos ocasiones. Esta técnica de detección es hasta el momento, la más empleada en electroforesis capilar, debido al fácil acoplamiento entre ambas. Sin embargo, presenta un inconveniente, que es su baja sensibilidad causada por las pequeñas dimensiones del paso óptico, como consecuencia de las pequeñas dimensiones de la columna capilar.

La detección electroquímica resulta más difícil de acoplar que la UV-Visible al sistema de electroforesis capilar, ya que es necesario aislar el voltaje y corriente de separación de los voltajes y corrientes de detección. Hasta el momento, no se ha puesto a punto ninguna metodología analítica para la determinación de amitrol empleando esta detección en electroforesis capilar, aunque si se ha mostrado que es posible su detección<sup>60</sup>.

A nivel general y debido a las características del amitrol, la detección electroquímica muestra claras ventajas frente al resto de detecciones. Es por ello que se han desarrollado diferentes sensores electroquímicos con el fin de conseguir una mejor respuesta electroquímica del analito y así obtener mejor sensibilidad y selectividad en los métodos de análisis. **Zen y col.**<sup>62,63</sup> han desarrollado varios sensores electroquímicos para la detección y determinación de amitrol.

En primer lugar un electrodo modificado químicamente ( $\text{Pb}_2\text{Ru}_{1.75}\text{Pb}_{0.25}\text{O}_{7-y}$ ), “*Nafion/Lead-ruthenium oxido pyrochlore*”<sup>62</sup>, empleado en la puesta a punto de dos métodos analíticos, uno utilizando voltamperometría de onda cuadrada (SWV) y otro análisis por inyección en flujo (FIA). El límite de detección obtenido en el primer caso es de  $32 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  y en el segundo  $7.5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ . Ambos métodos han sido aplicados satisfactoriamente en agua de consumo y agua de lago.

En segundo lugar, en 2001 se desarrolla un electrodo de película gruesa modificado “*nontronite-coated screen-printed*”<sup>63</sup> para el análisis del herbicida en agua superficial y de lago. De nuevo, lo emplean en la puesta a punto de dos nuevas metodologías, una por SWV y otro por FIA. En ambos casos se alcanzan unos límites de detección de  $28$  y  $3.5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente.

Nuestro grupo de investigación ha puesto a punto un método para la determinación de amitrol en formulaciones comerciales por FIA con detección amperométrica, empleando un electrodo de pasta de carbono modificado con cobalto ftalocianina<sup>64</sup>. El límite de detección alcanzado es de  $0.04 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Recientemente, se ha estudiado el comportamiento del amitrol sobre un electrodo de pasta de carbono modificado con nanopartículas de hierro (II) ftalocianina<sup>65</sup>. En este caso la detección del herbicida se realiza por cronoamperometría. El límite de detección alcanzado es  $0.305 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Para finalizar, cabe mencionar el trabajo desarrollado por **Schwarz y Kaden** en el año 2000<sup>66</sup>, en el que utilizando un conjunto de microelectrodos de oro "*microarray gold electrode*" es posible la detección amperométrica de amitrol a  $-0.14 \text{ V}$  debido a la reducción de este herbicida en este tipo de electrodo.



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



## 2.1 OBJETIVOS

En el trabajo que se presenta se han establecido los siguientes **OBJETIVOS**:

**2.1.1** Utilización de la electroforesis capilar con detección UV para la determinación de amitrol e hidroxiatrazina.

Aplicación de la metodología electroforética desarrollada para el control en el seguimiento de procesos degradativos del amitrol y para el análisis de rutina de amitrol en muestras de agua, realizando previamente la elección de procedimientos de extracción, limpieza y preconcentración adecuados.

**2.1.2** Utilización de la electroforesis capilar con detección dual (UV/Electroquímica) para la determinación de amitrol y su producto de degradación, urazol.

Aplicación de la metodología electroforética desarrollada en el análisis de rutina de muestras de agua mineral y productos agroalimentarios, realizando previamente la elección de los procedimientos de extracción, limpieza y preconcentración adecuados para las diferentes matrices.

**2.1.3** Estudios electroquímicos en estático y dinámico para conocer el comportamiento redox del herbicida en un electrodo de *"glassy carbon"*, como base para poner a punto métodos de detección y determinación de amitrol, y estudiar la posibilidad de emplearlo posteriormente en la detección electroquímica acoplada a electroforesis capilar.

Puesta a punto de la metodología necesaria para la determinación de amitrol en muestras de agua de río, utilizando como electrodo de trabajo un electrodo de *"glassy carbon"*.

**2.1.4** Desarrollo, estudio y elección de sensores electroquímicos con base de carbono para su uso en la determinación electroquímica de amitrol. Determinación de amitrol por voltamperometría de adsorción-redisolución utilizando un electrodo de pasta de nanotubos de carbono (CNTPE).

Aplicación de la metodología electroanalítica para el análisis de amitrol en muestras de agua.

## 2.2 PLAN DE TRABAJO

El trabajo se ha desarrollado de acuerdo con el siguiente **PLAN DE TRABAJO:**

### **SEPARACIÓN Y DETERMINACIÓN DE AMITROL E HIDROXIATRAZINA POR ELECTROFORESIS CAPILAR CON DETECCIÓN UV. ESTUDIOS DE DEGRADACIÓN.**

- Ensayos previos.
- Elección del pH y naturaleza del electrolito de separación.
- Influencia del voltaje aplicado.
- Condiciones de introducción de muestra. Reproducibilidad.
- Estudios de modificadores del flujo.
- Estudios de fuerza iónica.
- Estudios de la longitud efectiva de la columna.
- Influencia de la concentración de analito.
  - ✓ Características analíticas del método.
- Estudios de degradación.
- Determinación de amitrol en muestras de agua.
  - ✓ Elección del procedimiento de preconcentración.

### **SEPARACIÓN Y DETERMINACIÓN DE AMITROL Y URAZOL POR ELECTROFORESIS CAPILAR CON DETECCIÓN DUAL (UV/ELECTROQUÍMICA).**

- Ensayos previos.
- Influencia de pH y naturaleza del electrolito de separación.
- Influencia de la concentración del electrolito de separación.
- Influencia del voltaje de separación.
- Condiciones de introducción de muestra.
- Influencia de la longitud de columna.
- Elección del electrodo de trabajo.
- Influencia del potencial de detección.
- Estudios de reproducibilidad y estabilidad de señal.
- Influencia de la concentración de analito.
  - ✓ Características analíticas del método.
- Determinación de amitrol y urazol en agua mineral y en manzanas.



- ✓ Elección de los procedimientos de extracción, limpieza y preconcentración adecuados para las diferentes matrices.

### **ESTUDIO ELECTROQUÍMICO DE AMITROL UTILIZANDO UN ELECTRODO DE “GLASSY CARBON”.**

- Estudio electroquímico con electrodo estático por voltamperometría cíclica y de barrido lineal:
  - ✓ Influencia del medio de medida.
  - ✓ Influencia del potencial inicial y sentido del barrido.
  - ✓ Influencia de la velocidad de barrido.
  - ✓ Influencia de la concentración de amitrol.
  - ✓ Estudios de adsorción en el electrodo.
- Determinación del número de electrones:
  - ✓ Culombimetría a potencial controlado.
  - ✓ Voltamperometría de barrido lineal.
- Estudio electroquímico con electrodo rotatorio:
  - ✓ Cumplimiento de las ecuaciones de Levich y Koutecky-Levich.
  - ✓ Influencia de la temperatura en la corriente límite.
  - ✓ Influencia de la concentración de amitrol.
- Propuesta del mecanismo del proceso electródico.
  - ✓ Reversibilidad.
  - ✓ Identificación de los productos de la electrolisis.
  - ✓ Mecanismo electródico.
- Determinación de amitrol en aguas.
  - ✓ Estudio de los procesos de extracción y preconcentración.

### **ESTUDIOS ELECTROANALÍTICOS DE AMITROL EN ELECTRODOS DE NANOTUBOS DE CARBONO. DETERMINACIÓN DE AMITROL POR VOLTAMPEROMETRIA DE ADSORCIÓN-REDISOLUCIÓN UTILIZANDO UN ELECTRODO DE PASTA DE NANOTUBOS DE CARBONO.**

- Estudios de activación de los electrodos.
- Influencia del medio de medida.
- Influencia de la concentración de amitrol.
- Estudios de adsorción de amitrol en electrodos de pasta de nanotubos de carbono, preparados con “*multi-wall carbon nanotubes*”, pretratados.

- Estudios de las condiciones óptimas de preconcentración de amitrol en los electrodos de nanotubos de carbono:
  - ✓ Influencia del pH de preconcentración.
  - ✓ Influencia del medio de preconcentración.
  - ✓ Influencia del tiempo de preconcentración.
  - ✓ Influencia del potencial de preconcentración.
- Influencia del tiempo de equilibrado.
- Influencia de la concentración de amitrol.
  - ✓ Características analíticas del método.
- Estudios de repetitividad.
- Estudios de estabilidad de los electrodos.
- Estudios de interferencias.
- Determinación de amitrol en muestras de agua.

### **3. PARTE EXPERIMENTAL**



### 3.1 APARATOS Y MATERIAL

#### Aparatos:

- Analizador electroquímico BAS modelo CV 27 acoplado a un registro BAS x-y.
- Analizador electroquímico BAS modelo 100 B, acoplado a un ordenador Pentium 4 con software BAS100W versión 2.3.
- Electrodo rotatorio modelo BAS RDE-1.
- Equipo de electroforesis capilar, modelo SpectraPHORESIS 100 equipado con un detector UV-Visible de longitud de onda variable SC100, acoplado a un ordenador Pentium 2 con software Chrom-Card con dos canales de adquisición de datos.
- Celda electroquímica<sup>67</sup>, acoplada al equipo de electroforesis capilar.
- Detector amperométrico modelo BAS LC-4C, especialmente preparado para electroforesis capilar, conectado al segundo canal de adquisición del software Chrom-Card.
- Espectrofotómetro UV-visible MILTON ROY modelo Spectronic 3000 Array.
- Espectrofotómetro FT-IR Broker IFS 60V.
- Microscopio de barrido electrónico Hitachi S3000N.
- Rotavapor STRIKE 202.
- pH-metro METROHM modelo 645 provisto de un electrodo combinado de vidrio y calomelanos.
- Baño de ultrasonidos, NAHITA.
- Vortex, VELP SCIENTIFICA, Rx<sup>3</sup>.
- Agitador magnético, HEIDOLPH- MR 30001 y Agimatic, Ref 243.
- Balanza analítica, KERN.
- Liofilizador FTS Systems.

#### Material utilizado para la fabricación de electrodos:

- Tornillos de polipropileno para FIA (diámetro interno de 1/16 pulgadas).
- Pegamento de cianoacrilato, Loctite 401 e imprimación poliolefínica, Loctite 770, suministrados por cortesía de Loctite.
- Hilo de platino y plata de 1.0 mm de diámetro y varillas de “*glassy carbon*” de 1.0 mm de diámetro suministradas por Goodfellow.
- Varillas de grafito de 900  $\mu\text{m}$  de diámetro, suministradas por Pentel.

- Pasta de carbono preparada mezclando en una proporción 70:30 polvo de grafito Acheson #38, suministrado por Fisher Scientific y aceite mineral, suministrado por Sigma.
- Nanotubos de carbono “*multi-wall carbon nanotubes*” (20-50 nm de diámetro, 1-5  $\mu\text{m}$  y 5-20  $\mu\text{m}$  de longitud), suministrados por NanoLab.

**Electrodos:**

- Electrodo de trabajo de “*glassy carbon*” de 3.0 mm de diámetro (BAS MF-2012); y electrodo de referencia Ag/AgCl/KCl 3 mol L<sup>-1</sup> (BAS MF-2063), suministrados por BAS.
- Barra de carbono de 5.0 mm de diámetro y 100 mm de longitud, C007920 suministrada por Goodfellow.

**Material para el pulido de electrodos:**

- Alúmina de 0.05  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula, suministrada por BUEHLER.
- Alfombra de pulido nº 407212, suministrada por BUEHLER.
- Hoja de papel de pesada, nº Z13, 411-2, suministrada por Aldrich.

**Columna capilar:**

- Capilares de sílice de 365  $\mu\text{m}$  de diámetro externo y 75  $\mu\text{m}$  de diámetro interno con cobertura de poliimida, suministrados por Teknokroma.
- Cortador de capilares de zafiro, número de catálogo #20182, suministrado por Teknokroma.
- Pegamento tipo epoxi, Araldit<sup>®</sup>, de dos componentes y curado rápido, distribuido por Ceys S.A.
- Tubo de Nafion<sup>®</sup> de 380  $\mu\text{m}$  de diámetro interno, suministrado por Perma Pure Inc.
- Microfiltros de 45  $\mu\text{m}$ , suministrados por MFS Adventec.

**Tratamientos de muestras:**

- Filtros de disco de nailon MSI MAGNA de 0.45  $\mu\text{m}$  y 47 mm de diámetro, suministrados por OSMONICS INC.
- Cartuchos de extracción en fase sólida  $\text{C}_{18}$ -E, suministrados por Strata Phenomenex.
- Tubos de extracción en fase sólida de 12 mL, suministrados por ANALISIS VINICOS.
- Fase MFE<sup>®</sup>-Pack C8, suministrada por ANALISIS VINICOS.
- Fase MFE<sup>®</sup>-Pack Amino, suministrada por ANALISIS VINICOS.

## 3.2 REACTIVOS Y DISOLUCIONES

- Amitrol, hidroxiatrazina, atrazina y urazol de grado Pestanal<sup>®</sup>, suministrado por Riedel-de-Haën.

A partir del reactivo sólido se preparan disoluciones madre de concentración  $1.00 \times 10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup> en agua destilada en el caso de amitrol y urazol y en metanol en el caso de la hidroxiatrazina y atrazina, se almacenan en frascos topacio y bajo refrigeración. Las disoluciones de menor concentración se preparan por dilución del volumen apropiado de las disoluciones madre con agua destilada.

- Metanol de grado Pestanal<sup>®</sup>, suministrado por Riedel-de-Haën.
- Otros productos de calidad reactivo análisis: ácido clorhídrico, ácido fosfórico, peróxido de hidrógeno, ácido acético, ácido bórico, hidróxido sódico, dodecil sulfato sódico (SDS), ácido 2-(n-morfolin)etanosulfónico (MES), ácido cítrico, ácido ftálico, nitrato potásico, hexaciano ferrato (III) de potasio, etanol, agar-agar, cloruro potásico, fenolftaleína, cloruro amónico, ioduro potásico y ioduro de mercurio (II), suministrados por diferentes casas comerciales.
- Tampón Britton-Robinson de pH=1.8, preparado mezclando ácidos bórico, fosfórico y acético en concentración 0.040 mol L<sup>-1</sup>. A partir de ésta se preparan disoluciones tampón Britton-Robinson de diferentes valores de pH comprendidos entre 2.0 y 12.0, adicionando hidróxido sódico 0.10 mol L<sup>-1</sup> y midiendo el pH con un pH-metro.
- El resto de las disoluciones tampón utilizadas, se preparan por dilución adecuada con agua destilada del ácido concentrado adecuado, añadiendo hidróxido sódico 0.10 mol L<sup>-1</sup> y midiendo el pH con un pH-metro.
- El reactivo de Nessler (yodomercuriato potásico alcalino) es una mezcla en partes iguales de dos soluciones A y B. La solución A se prepara disolviendo 160 g de hidróxido sódico en 500 mL de agua destilada y la solución B disolviendo 70 g de ioduro potásico anhidro y 100 g de ioduro de mercurio (II) en 500 mL de agua destilada.
- Puente salino de Agar-Agar, preparado añadiendo 3.0 g de agar-agar, 30 g de cloruro potásico y 100 ml de agua destilada.
- Disolución de fenolftaleína al 1.0 % en etanol.
- Agua destilada obtenida a través de un sistema Milli-Q y Milli-RO y utilizada para la preparación de disoluciones y procedimientos de limpieza.
- Nitrógeno de pureza 99.999%, suministrado por Carbueros Metálicos, S. A.
- Muestras de agua:



- ✓ Muestras de agua de río, tomadas en el río Alberche en diferentes puntos de muestreo:

✓

**Punto 1:** Límite de la Comunidad Autónoma de Madrid, carretera M-540, pasado Villa de Prado.

**Punto 2:** En Aldea del Fresno (Puente), a la altura del cruce de las carreteras M-507 y M-510.

En estas zonas existen numerosas explotaciones agrícolas, principalmente de hortalizas, en las cuales se emplean diversos tipos de herbicidas. Estos llegan al río procedentes de procesos de lixiviado de los campos de cultivo, arrastrados por aguas de riego o lluvia y también disueltos en aguas de limpieza de las hortalizas antes de su venta y que después son eliminadas y, en ocasiones, vertidas al río.

- ✓ Agua mineral embotellada (BONAQUA) adquirida en un centro comercial de Madrid.
  
- Manzanas de diferentes variedades: Reineta, Fuji y Golden, adquiridas en un centro comercial de Madrid.

## 3.4 PROCEDIMIENTOS

### 3.4.1 ELECTROFORESIS CAPILAR

Todas las disoluciones utilizadas en la realización de los estudios en electroforesis capilar, se preparan diariamente y se microfiltran con cartuchos de 45  $\mu\text{m}$  antes de ser introducidas en el equipo de electroforesis capilar, con el fin de eliminar partículas cuyo tamaño pueda provocar obturaciones en el interior de la columna.

#### A. Separación y determinación de amitrol e hidroxiatrazina por electroforesis capilar de zona con detección UV

##### Acondicionamiento de la columna capilar:

Al empezar el día se realizan lavados consecutivos durante 3 min con hidróxido sódico 1.0 mol L<sup>-1</sup>, hidróxido sódico 0.1 mol L<sup>-1</sup>, agua destilada y el tampón de separación. Entre análisis, se realizan lavados consecutivos durante 3 min, con agua destilada y el tampón utilizado.

##### Condiciones de separación y medida:

- Tampón fosfato 0.020 mol L<sup>-1</sup> de pH 3.2.
- Voltaje de separación: 25.0 kV
- Corriente de separación: 22  $\mu\text{A}$
- Introducción de muestra en modo hidrodinámico durante 1.00 s
- Longitud efectiva y total de la columna: 45 y 80 cm, respectivamente.
- Detección UV a 200 nm.

##### Preparación de las muestras de agua de río:

Las muestras de agua se almacenan en frascos topacio. A continuación, se dopan por adición de la cantidad correspondiente de amitrol y posteriormente se filtran.

La preconcentración de amitrol se lleva a cabo por evaporación de las muestras según el siguiente procedimiento: 2.5 mL de muestra se evaporan a sequedad en un baño de agua a 50°C en atmósfera de nitrógeno, el residuo se reconstituye con 100  $\mu\text{L}$  de agua

destilada y se introduce directamente en el equipo de electroforesis capilar empleando para ello microviales de 100  $\mu\text{L}$ . A continuación se registran los electroferogramas en las condiciones óptimas de separación.

## **B. Separación y determinación de amitrol y urazol por electroforesis capilar de zona empleando detección dual UV/electroquímica.**

### **Acondicionamiento de la columna capilar:**

Al empezar el día se realizan lavados consecutivos durante 5 min con hidróxido sódico 1.0 mol  $\text{L}^{-1}$ , hidróxido sódico 0.1 mol  $\text{L}^{-1}$ , agua destilada y el tampón de separación. Entre análisis se realizan lavados consecutivos durante 5 min, con agua destilada y el tampón utilizado.

### **Fabricación de los electrodos de trabajo empleados:**

En el desarrollo de este trabajo se emplean dos electrodos de trabajo de diferente naturaleza, uno de “*glassy carbon*” y uno de grafito. El procedimiento de construcción de ambos es el mismo:

En primer lugar se aísla la varilla de grafito y de “*glassy carbon*” con una capa protectora de plástico en aerosol (Chemsearch)<sup>®</sup>. A continuación, se insertan las varillas en un tornillo de los utilizados en el análisis por inyección en flujo (FIA), se colocan centradas, y se fijan al tornillo mediante imprimación poliolfínica y pegamento de cianoacrilato. Para la realización del contacto eléctrico, el lado opuesto del tornillo se llena con pasta de carbono, y se inserta un tornillo de cobre. Antes de ser utilizado, es necesario pulir la superficie del electrodo para eliminar el aislante.

### **Fabricación del “*decoupler*”:**

Los pasos necesarios para la fabricación del “*decoupler*” en la columna capilar, son:

- 1) Eliminación de una pequeña porción de la capa de poliimida de la columna capilar situada a 2.0 cm de su extremo final.
- 2) Se protege la zona descubierta con un tubo de Nafion<sup>®</sup> de 1.0 cm de largo.
- 3) El tubo de Nafion<sup>®</sup> se fija a la columna capilar mediante pegamento de tipo epoxi, siguiendo las instrucciones del fabricante.

- 4) Cuando la unión es firme, alrededor de las 24 horas, se realiza una ligera presión sobre la zona sin poliimida hasta generar una fractura en el capilar. Los dos fragmentos vuelven de inmediato a su posición original, quedando unidos por el tubo de Nafion<sup>®</sup> y el pegamento. De esta forma, el volumen muerto del “*decoupler*” es prácticamente cero.

**Condiciones de separación y medida:**

- Tampón acetato 0.030 mol L<sup>-1</sup> de pH 4.5.
- Voltaje de separación: 25.0 kV.
- Corriente de separación: 13 μA
- Introducción de muestra en modo hidrodinámico durante 1.50 s.
- Longitud de la columna capilar: 92 cm.
- Longitud efectiva en detección UV: 60 cm.
- Longitud efectiva en detección electroquímica: 92 cm.
- Posición del “*decoupler*”: 2 cm del final de la columna.
- Detección UV: 200 nm.
- Detección electroquímica:
  - ✓ Electrolito en celda electroquímica: tampón acetato 0.050 mol L<sup>-1</sup> de pH 4.5.
  - ✓ Electrodo de trabajo: Disco de grafito de 0.9 mm de diámetro, previamente activado potencioestáticamente aplicando un potencial de 1500 mV durante un minuto en una disolución de hidróxido sódico 0.10 mol L<sup>-1</sup>.
  - ✓ Electrodo auxiliar: Varilla de platino.
  - ✓ Electrodo de referencia: Varilla de plata.
  - ✓ Potencial aplicado: 1050 mV.

**Preparación de las muestras de manzana:**

Para la extracción de amitrol y urazol en muestras de manzana se emplea la técnica de dispersión de matriz en fase sólida (MSPD). En primer lugar, las muestras se homogenizan triturándose, se dividen en porciones y se congelan. A continuación, en un mortero de vidrio, se pone junto a los 0.50 g de manzana, previamente dopada con amitrol y urazol, 0.50 g del adsorbente MFE<sup>®</sup>-pak amino. Se trabaja íntimamente la mezcla en el mortero, durante 10 min y se transfiere a un cuerpo de jeringa. Los analitos son eluidos haciendo pasar 5.0 mL de agua destilada a través de la jeringa. Con el fin de eliminar interferentes, estos 5.0 mL de eluato, se hacen pasar a través de un cartucho de extracción en fase sólida (SPE), C<sub>18</sub>, previamente activado con 5.0 mL de metanol y 5.0 mL de agua. El

eluato, una vez microfiltrado, se introduce en el equipo de electroforesis capilar, registrando los electroferogramas en las condiciones óptimas establecidas. El procedimiento descrito, queda resumido en la figura 2.

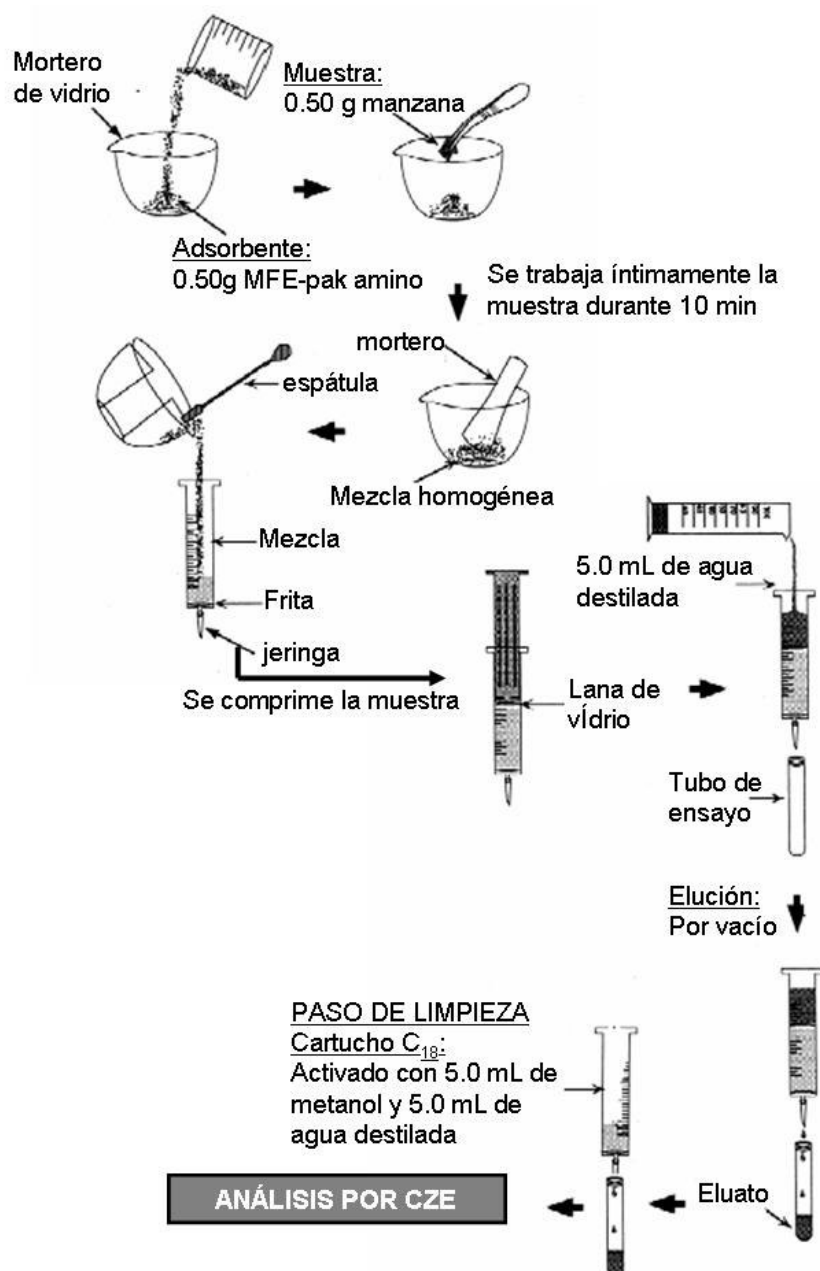


Figura 2.- Determinación de amitrol y urazol en muestras de manzanas por MSPD-CZE.

### **Preparación de las muestras de agua mineral:**

Se adquieren varias botellas de 1.5 L de agua mineral (BONACUA) en un centro comercial. El agua se dopa con amitrol en diferentes niveles de concentración y se almacena a temperatura ambiente. Se toman alícuotas de 50.0 mL las cuales se someten a un proceso de limpieza haciéndolas pasar a través de un cartucho de extracción en fase sólida, C<sub>18</sub>, previamente activado con 5.0 mL de metanol y 5.0 mL de agua. El eluato se evapora a sequedad en un rotavapor a 60°C y 125 rpm. El residuo se reconstituye con 500 µL de agua destilada y se introduce una vez microfiltrado, directamente en el equipo de electroforesis capilar, obteniéndose los electroferogramas en las condiciones óptimas de separación y detección establecidas.

### **3.4.2 ESTUDIOS ELECTROANALÍTICOS DE AMITROL**

#### **A. Estudio electroanalítico de amitrol en electrodo de “glassy carbon”**

##### **Acondicionamiento de los electrodos de trabajo:**

El acondicionamiento de los electrodos de “glassy carbon” utilizados en la realización de estos estudios, consiste en un pulido con alumina de 0.05 µm sobre una alfombra de pulido durante un minuto, seguido de un lavado de la superficie con agua destilada. El acondicionamiento del electrodo se realiza siempre antes de cada medida.

##### **Estudios por voltamperometría y cronoamperometría:**

Para las medidas por voltamperometría cíclica, voltamperometría lineal con electrodo rotatorio, y cronoamperometría, se utiliza como electrodo auxiliar una varilla de platino y como electrodo de referencia un electrodo comercial de Ag/AgCl/KCl 3 mol L<sup>-1</sup>.

##### **Estudios coulombimétricos:**

En el estudio coulombimétrico se emplea como electrodo de trabajo, un electrodo de grafito de gran tamaño, y como electrodos de referencia y auxiliar un electrodo comercial de Ag/AgCl/KCl 3 mol L<sup>-1</sup> y una placa de platino, respectivamente.

**Preparación de las muestras de agua de río:**

Las muestras de agua se toman en diferentes puntos del río Alberche, se dopan con la cantidad apropiada de amitrol y se filtran.

Para la preconcentración de la muestra de agua, se emplea la extracción en fase sólida previa formación de un par iónico (SPE-IP). Se toman 200 mL del agua y se le añaden  $4.6 \times 10^{-4}$  moles de SDS y ácido fosfórico en concentración  $0.026 \text{ mol L}^{-1}$  ajustando su pH a 3.0. Seguidamente, la muestra se hace pasar a través de un cartucho de extracción en fase sólida,  $C_{18}$ , previamente activado con 6.0 mL de metanol y 6.0 mL de agua. El amitrol retenido se eluye con 2.00 mL de tampón fosfato  $0.026 \text{ mol L}^{-1}$  de pH 11.0. Una vez finalizada la elución, se ajusta el pH a 2.0 con 150  $\mu\text{L}$  de ácido fosfórico concentrado y se realiza la medida por voltamperometría de barrido lineal entre 400 y 1500 mV a una velocidad de barrido de  $50 \text{ mV s}^{-1}$ .

**B. Estudios electroanalíticos de amitrol en electrodos de pasta de nanotubos de carbono (CNTPE). Voltamperometría de adsorción redisolución de amitrol****Preparación de los electrodos de pasta de nanotubos de carbono (CNTPEs):**

La pasta de los electrodos se prepara por mezcla de “*multi-wall carbon nanotubes*” (MWCNTs) de diferentes longitudes (cortos: 1-5 $\mu\text{m}$  o largos: 5-20 $\mu\text{m}$ ) con aceite mineral en proporción 50:50. Esta pasta se introduce en un tubo de teflón de 0.8 mm de diámetro interno, incorporando en el interior de la pasta un cable de cobre, que se fija al tubo de teflón mediante imprimación poliolefínica y pegamento cianoacrilato, para realizar el contacto eléctrico.

**Activación de los CNTPEs:**

Los electrodos se activan potenciodinámicamente por voltamperometría cíclica, realizando 75 ciclos entre -1.00 y 1.50 V en tampón fosfato  $0.050 \text{ mol L}^{-1}$  de pH 7.4 a una velocidad de barrido de  $1.0 \text{ V s}^{-1}$ .

### **Realización de la medida:**

En todas las medidas se emplean, como electrodo de referencia un electrodo comercial de Ag/AgCl/KCl 3 mol L<sup>-1</sup> y una varilla de platino como electrodo auxiliar.

La medida por voltamperometría de adsorción-redisolución se realiza en dos etapas:

**Etapa de preconcentración:** Se sumerge el electrodo previamente activado en una disolución de amitrol en tampón acetato 0.050 mol L<sup>-1</sup> de pH 4.5, durante 300 s, aplicando un potencial de 500 mV y agitada a 300 rpm.

**Etapa de medida:** El electrodo se saca de la disolución de preconcentración, se lava con agua destilada y se transfiere a la celda de medida que contiene tampón acetato 0.050 mol L<sup>-1</sup> de pH 4.5. La medida se realiza por voltamperometría de barrido lineal, entre 600 y 1100 mV a una velocidad de barrido de 50 mV s<sup>-1</sup>.

### **Preparación de las muestras de agua:**

Se utilizan muestras de agua de grifo y muestras de agua del río Alberche. Las muestras se dopan con la cantidad apropiada de amitrol y se filtran. Se pipetea 5.0 mL de agua, y se ajusta el electrolito de preconcentración añadiendo 125 µL de tampón acetato 2.0 mol L<sup>-1</sup> de pH 4.5. A continuación se realiza la medida electroquímica según el procedimiento descrito.



## **4. DETERMINACIÓN DE AMITROL POR ELECTROFORESIS CAPILAR.**



En base a los objetivos planteados en esta Memoria, se ha llevado a cabo el desarrollo de dos metodologías analíticas, para el seguimiento, detección y determinación del herbicida amitrol empleando la electroforesis capilar de zona (CZE).

En este capítulo, se presenta una introducción a la técnica y posteriormente se describen los resultados experimentales obtenidos para la consecución de los dos primeros objetivos planteados.

En primer lugar se presenta una metodología analítica para la separación, detección y determinación de amitrol e hidroxiatrazina, por electroforesis capilar de zona empleando la detección UV.

La hidroxiatrazina (2-hidroxi-4-etilamino-6-isopropilamino-1,3,5-triazina) es el principal producto de degradación del herbicida triazínico atrazina (2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-1,3,5-triazina). Los herbicidas triazínicos, forman un amplio grupo de sustancias agroquímicas específicamente diseñadas para destruir plantas pre y post-emergentes (alrededor del 30% de todos los herbicidas son triazínicos). Están sujetos a varios procesos de degradación en el medio, siendo su principal vía de degradación la desalquilación de las aminas en posición 4 y 6 y/o a través de la hidrólisis del sustituyente en posición 2<sup>68</sup>. La atrazina es uno de los herbicidas más utilizados y su producto de degradación, la hidroxiatrazina es uno de los contaminantes más encontrados en ríos y lagos<sup>68</sup>.

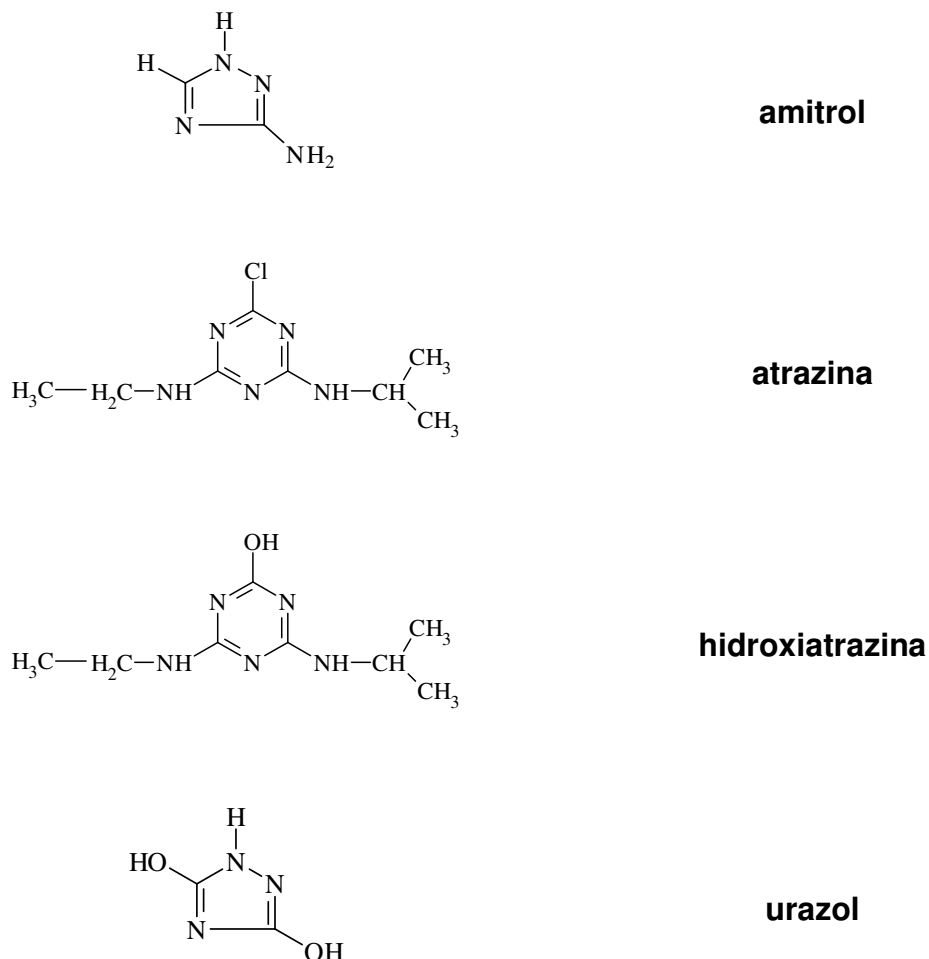
Posteriormente, el método desarrollado se aplica para estudiar la estabilidad de amitrol y de atrazina en medio acuoso, utilizándolo como método de seguimiento de los procesos degradativos de estos herbicidas en diferentes medios y condiciones. Además, se aplica también para la determinación de amitrol en agua de río.

En segundo lugar, se pone a punto un método para la separación, detección y determinación de amitrol y urazol por electroforesis capilar de zona con detección dual (UV/electroquímica).

El urazol (3,5-dihidroxi-1,2,4-triazol) ha sido identificado como el producto principal de la degradación fotoquímica de amitrol en disolución acuosa<sup>69</sup>, y como uno de los productos de su degradación en suelos y plantas de manzano a los que previamente se había tratado con amitrol<sup>70</sup>.

La metodología desarrollada se aplica a la determinación de amitrol y su metabolito en un agua mineral comercial y en manzanas.

La figura 3 muestra las estructuras moleculares de los compuestos.



**Figura 3.- Estructura molecular de amitrol, atrazina, hidroxiatrazina y urazol.**

Los estudios de detección y determinación de amitrol y urazol por CZE con detección dual (UV/electroquímica) se han realizado una vez finalizados los estudios electroquímicos de amitrol en electrodo de "glassy carbon", descritos en el capítulo 5, pero con el fin de agruparlos por la técnica empleada se recogen en este capítulo.

La electroforesis capilar fue utilizada por primera vez como herramienta analítica por el químico sueco **Tiselius** (1930),<sup>71</sup> sin embargo, sus verdaderas posibilidades no empezaron a vislumbrarse hasta 1974 cuando **Virtanen**<sup>72</sup> demostró las ventajas que se obtenían al realizar separaciones electroforéticas en tubos de vidrio de 200 a 500  $\mu\text{m}$  de diámetro interno. En 1979 se obtuvieron separaciones electroforéticas en tubos de teflón de 200  $\mu\text{m}$  de diámetro interno, con alturas de plato teórico inferiores a 10  $\mu\text{m}$ , logrando en este momento un mayor refinamiento de la técnica<sup>73</sup>. Pero el impulso definitivo llegó gracias a los trabajos de **Jorgenson y Lukacs** (1981), considerados como el punto de partida que lleva a la concepción actual de la técnica<sup>74,75</sup>. Los primeros estudios sobre los principios de funcionamiento de la electroforesis capilar no aparecieron hasta 1983<sup>76</sup> y no se dispuso del primer equipo comercial hasta 1989.

Sin embargo, a pesar de ser una técnica relativamente reciente en cuanto a implantación en laboratorios, el desarrollo experimentado en los últimos años ha sido espectacular ya que presenta enormes posibilidades debido a sus características, algunas de las cuales se enumeran a continuación:

- Elevada eficacia, alcanzándose de  $10^5$  a  $10^6$  platos teóricos.
- Separaciones rápidas.
- Puesta a punto de métodos simple y rápida.
- Bajo coste, derivado del escaso consumo de muestra y reactivos.
- Bajo impacto ambiental, el nivel de residuos generado es muy reducido.
- Fácilmente automatizable.

Su principal limitación se encuentra en las dimensiones del capilar (diámetros inferiores a 75  $\mu\text{m}$ ) y en las pequeñas cantidades de analito introducidas (del orden de los nL), ambas comprometen la sensibilidad que puede alcanzar el sistema de detección que se acopla al equipo de electroforesis capilar y que generalmente es la detección UV/Visible.

## **Principios básicos de separación**

La electroforesis capilar es una técnica de separación basada en el diferente movimiento neto de sustancias cargadas y no cargadas, en el interior de un capilar, bajo la influencia de un campo eléctrico elevado. El movimiento de las diferentes sustancias en el

interior de una columna capilar es el resultado del efecto conjunto de dos fenómenos que tienen lugar simultáneamente:

- Electromigración
- Electroósmosis

La electromigración consiste en el movimiento neto de los analitos como consecuencia de las fuerzas electrostáticas a las que están sometidas las sustancias cargadas en presencia de un campo eléctrico. Estas fuerzas electrostáticas provocan el movimiento de cada partícula cargada bajo la influencia de un campo eléctrico ( $E$ ) [ $V\text{ cm}^{-1}$ ] con una velocidad lineal de migración electroforética ( $v_{ep}$ ) [ $\text{cm s}^{-1}$ ], de forma que existe una proporcionalidad directa entre esta velocidad y el campo eléctrico:

$$v_{ep} = \mu_{ep} E \quad (1)$$

el factor de proporcionalidad ( $\mu_{ep}$ ) [ $\text{cm}^2\text{ s}^{-1}\text{ V}^{-1}$ ], se denomina **movilidad electroforética**. La movilidad electroforética es propia de cada partícula y representa la velocidad media de una especie cargada por unidad de campo eléctrico:

$$\mu_{ep} = \frac{q_i}{6\pi r_i \eta} \quad (2)$$

donde  $q_i$  [ $C$ ] es la carga neta del ión,  $r_i$  [ $\text{cm}$ ] representa el radio del ión solvatado y  $\eta$  [ $\text{Kg s}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ ] la viscosidad del medio. Es evidente que especies de pequeño tamaño y grandes valores de carga presenten las mayores movilidades. La temperatura es uno de los factores que mayor influencia ejerce sobre la movilidad electroforética, ya que la viscosidad del medio disminuye cuando aquella aumenta, por lo que la movilidad del ión será mayor cuanto más alta sea la temperatura.

La electroósmosis, es un fenómeno que se produce siempre que se aplica un campo eléctrico a un sistema líquido (medio electroforético) que esté en contacto directo con una superficie cargada (interior de la columna capilar), dando como resultado un movimiento global de la disolución, que se conoce con el nombre de **movilidad electrosmótica**.

Para entender el fenómeno de electroósmosis debe plantearse en primer lugar la ionización de las paredes del capilar, la cual puede ser debida a procesos de adsorción de iones o a equilibrios ácido-base del material del que esté fabricado. Los capilares de sílice

fundida, que son los más utilizados en electroforesis capilar, tienen grupos silanol ( $\text{SiOH}$ ) en su superficie que se ionizan, pudiendo estar cargados positivamente ( $\text{SiOH}_2^+$ ), negativamente ( $\text{SiO}^-$ ), o neutros, dependiendo del pH de la disolución de electrolito que la rodee. Cuando el pH de la disolución tampón es superior a 3 la superficie del capilar se encuentra cargada negativamente (figura 4). Una vez ionizada la pared, para mantener la electroneutralidad, se produce una atracción de carácter electrostático entre los iones de la disolución con carga positiva y esta pared, compensando su carga. Estos iones se disponen espacialmente formando una doble capa adyacente a la pared del capilar. Se forma una primera capa estrecha e inmóvil de cationes cercanos a la superficie, denominada “capa fija”, que neutraliza parcialmente la carga. La carga negativa remanente es neutralizada por el exceso de los cationes solvatados móviles de la segunda capa, denominada “capa móvil” o “capa difusa”. Cuando se aplica un campo eléctrico a lo largo de la superficie cargada, los iones de la capa móvil se pueden mover mientras que los de la “capa fija” no. Puesto que los iones se encuentran solvatados, en su movimiento arrastran el agua asociada. Los aniones son atraídos hacia el ánodo y los cationes hacia el cátodo. En la “capa móvil” hay un exceso de cationes solvatados, por lo que el resultado es un movimiento neto de la disolución hacia el cátodo, el cual recibe el nombre de flujo electrosmótico.

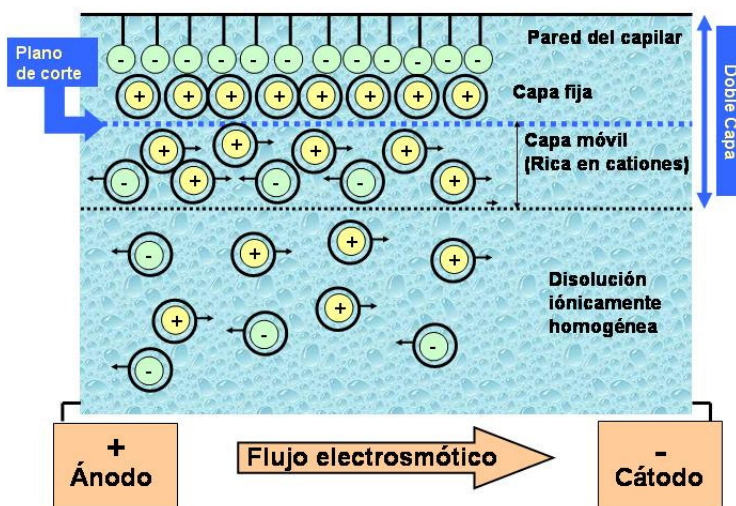


Figura 4-. Flujo electrosmótico

Entre las capas fija y móvil de la doble capa, existe un plano de corte en el cual se crea una descompensación eléctrica que genera una diferencia de potencial denominada

potencial zeta ( $\zeta$ ) [V], que depende del espesor de la doble capa ( $\delta$ ) [cm], de la carga fundamental ( $e_o$ ) y de la constante dieléctrica del medio ( $\epsilon$ ) [C m V<sup>-1</sup>].

$$\zeta = \frac{4\pi\delta e_o}{\epsilon} \quad (3)$$

La movilidad electrosmótica  $\mu_{eo}$  [cm<sup>2</sup> s<sup>-1</sup> V<sup>-1</sup>] esta relacionada con el potencial zeta por la siguiente expresión:

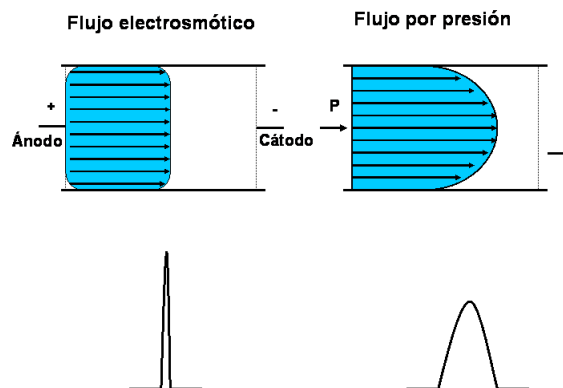
$$\mu_{eo} = \frac{\epsilon\zeta}{4\pi\eta} \quad (4)$$

y depende principalmente de las características de la disolución tampón, siendo independiente de la naturaleza de los analitos a separar.

Por lo que la velocidad lineal del flujo electrosmótico ( $v_{eo}$ ) [cm s<sup>-1</sup>] que depende del campo eléctrico aplicado ( $E$ ) [V cm<sup>-1</sup>] entre los dos extremos de la columna capilar, se puede expresar como:

$$v_{eo} = \frac{\epsilon\zeta}{4\pi\eta} E \quad (5)$$

Una de las características del flujo electrosmótico en columnas capilares de diámetro interno menor de 300  $\mu\text{m}$  es su perfil cuasi plano, que contribuye enormemente a la elevada resolución y eficacia que se consigue en las separaciones por electroforesis capilar, debido a que las fuerzas inductoras del flujo están distribuidas uniformemente a lo largo de la superficie cargada (a lo largo de la pared del capilar). En la figura 5 se muestra el perfil cuasi plano del flujo electrosmótico en contraste con un flujo generado por presión, que originaría un flujo laminar o parabólico.



**Figura 5.- Perfiles de flujo**



Como consecuencia del flujo cuasi plano, el pico se ensancha mucho menos lo que origina que se obtenga una mayor resolución y eficacia que en cromatografía líquida de alta resolución. Este perfil plano solo se ve alterado en el límite entre la “capa fija” y la “capa móvil” (plano de corte), debido al rozamiento entre ambas capas y a la caída del potencial zeta en la capa fija.

En resumen y teniendo en cuenta los procesos explicados anteriormente, la movilidad neta ( $\mu_{tot}$ ) de cada sustancia es la suma de sus movilidades electroforética y electrosmótica, y por consiguiente su velocidad neta o total ( $v_{tot}$ ) la suma de las velocidades electroforética y electrosmótica.

$$\mu_{tot} = \mu_{eo} + \mu_{ep} \quad (6)$$

Teniendo en cuenta estos hechos, el orden de migración de los analitos hacia el detector empleando una columna capilar de sílice y situando el detector cerca del cátodo, puede observarse en la figura 6. En primer lugar migrarán las sustancias catiónicas de pequeño tamaño y carga elevada, a continuación las sustancias catiónicas de gran tamaño y pequeña carga, después, las sustancias neutras, que migrarán todas a la velocidad del flujo electrosmótico, seguirán las sustancias aniónicas de gran tamaño y pequeña carga y finalmente las sustancias aniónicas de pequeño tamaño y carga elevada.

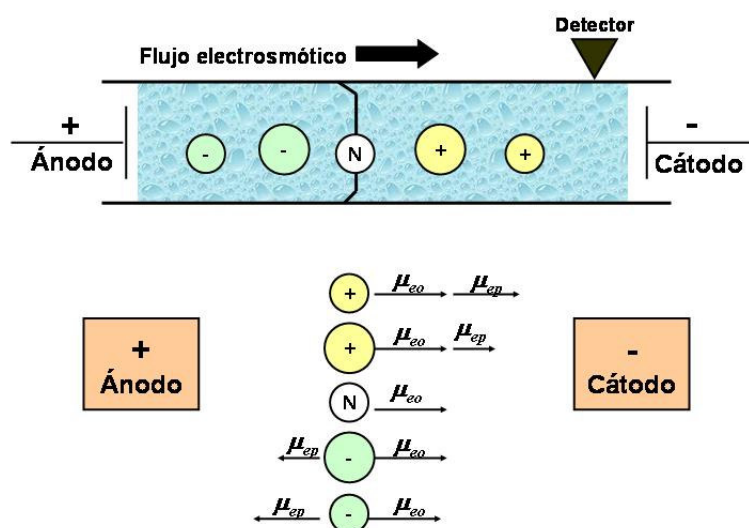


Figura 6-. Esquema de separación mediante electroforesis capilar en presencia de flujo electrosmótico.

## Parámetros que caracterizan la separación

El tiempo de migración, la eficacia, la resolución y la selectividad son los parámetros que caracterizan la separación, haremos una breve introducción a cada uno de ellos.

- **Tiempo de migración ( $t_m$ ):** Es el tiempo que tarda el analito en migrar desde el punto de introducción de muestra hasta el detector. A esa distancia se la denomina longitud efectiva del capilar ( $l$ ). El tiempo de migración puede calcularse mediante la expresión general:

$$t_m = \frac{lL}{(\mu_{ep} + \mu_{eo})V} \quad (7)$$

En ella, el  $t_m$  queda expresado en función de las movilidades electroforética y electrosmótica [ $\text{cm}^2 \text{s}^{-1} \text{V}^{-1}$ ], de la longitud efectiva ( $l$ ) [cm], de la longitud total de la columna capilar ( $L$ ) [cm] y del voltaje aplicado entre los extremos de la columna capilar ( $V$ ) [V]. De esta expresión se deduce que voltajes altos, capilares cortos y flujos electrosmóticos altos, dan lugar a tiempos de migración menores, y por tanto análisis más cortos.

- **Eficacia:** La eficacia en los sistemas electroforéticos se cuantifica con los mismos términos que en cromatografía (teniendo en cuenta la similitud que existe entre los cromatogramas y los electroferogramas), mediante la altura de plato teórico ( $H$ ) y el número de platos teóricos ( $N$ ).

En electroforesis capilar, hemos señalado que los solutos se mueven a través del capilar con un flujo cuasi plano y no parabólico por lo que el pico se ensancha mucho menos que en el caso de la cromatografía líquida. Desde un punto de vista teórico, existen varios factores que pueden contribuir al ensanchamiento de la zona de soluto, y por tanto disminuir la eficacia. Estos factores son: la difusión molecular del analito a lo largo de la dirección de migración y la dispersión por efecto térmico debido al perfil parabólico de temperatura en el interior del capilar. Además, debe considerarse la dispersión originada por fenómenos de adsorción sobre las paredes del capilar y por último el ensanchamiento producido por la introducción de muestra y por el detector.

Trabajando bajo condiciones ideales, el principal mecanismo de ensanchamiento puede reducirse a la difusión longitudinal y puede ser expresada en función de su varianza espacial ( $\sigma^2$ ), mediante la ecuación de **Einstein**:

$$\sigma^2 = 2Dt \quad (8)$$

donde  $D$  [ $\text{cm s}^{-2}$ ] es el coeficiente de difusión del analito y  $t$  [s] el tiempo que necesita el analito para llegar al detector. Sustituyendo en esta expresión el valor del tiempo de migración (expresión 7), resulta:

$$\sigma^2 = \frac{2DIL}{(\mu_{ep} + \mu_{eo})V} \quad (9)$$

Según **Giddings (1969)**<sup>77</sup>, el número de platos teóricos se puede expresar como:

$$N = \left( \frac{L}{\sigma} \right)^2 \quad (10)$$

Sustituyendo el valor de  $\sigma$  (expresión 9) en esta ecuación, resulta la siguiente expresión para el número platos teóricos:

$$N = \frac{(\mu_{ep} + \mu_{eo})V}{2D} \quad (11)$$

Dado que para un analito  $D$  y  $\mu_{rot}$  son constantes, se deduce que la efectividad en la separación solo depende del voltaje aplicado. El voltaje límite en la práctica es de 30 kV y el límite de intensidad de corriente está limitado por el llamado “efecto Joule”. Este fenómeno es uno de los mayores problemas que surgen al realizar un proceso de electroforesis, ya que el calor generado debido al paso de una corriente por un conductor, calienta la disolución provocando la aparición de gradientes de temperatura y cambios locales de viscosidad que ensanchan las zonas ocupadas por los solutos.

Experimentalmente, el número de platos teóricos puede calcularse a partir del electroferograma, midiendo el tiempo de migración y la anchura de pico en la base del mismo o a la mitad de su altura, por las siguientes expresiones:

$$N = 16 \left( \frac{t_m}{w} \right)^2 \quad (12)$$

$$N = 5.54 \left( \frac{t_m}{w_{1/2}} \right)^2 \quad (13)$$

donde  $t_m$  [s] es el tiempo de migración del analito,  $w$  [s] es la anchura en la base y  $w_{1/2}$  [s] es la anchura a la mitad de su altura. De esta expresión se deduce que cuanto más estrecho sea un pico y más largo su tiempo de migración, mayor será la eficacia de la separación.

- **Resolución:** Se trata del parámetro más importante en cualquier técnica de separación. Es la capacidad para separar dos analitos en una mezcla.

Tanto **Giddings**<sup>77</sup> (1969) como **Jorgenson y Lukacs**<sup>75</sup> (1981), dedujeron la siguiente expresión para la evaluación final de la resolución en electroforesis capilar:

$$R = 0.177(\mu_A - \mu_B) \sqrt{\frac{V}{D(\bar{\mu}_{tot} + \mu_{eo})}} \quad (14)$$

En ella se observa que la resolución depende del voltaje aplicado y es máxima cuando la media de las movilidades netas ( $\bar{\mu}_{tot}$ ) y la movilidad electrosmótica ( $\mu_{eo}$ ) tienen magnitudes iguales y de signo contrario.

Experimentalmente puede calcularse mediante las siguientes expresiones:

$$R = \frac{2(t_{mB} - t_{mA})}{w_A + w_B} \quad (15)$$

$$R = \frac{t_{mB} - t_{mA}}{w_{1/2A} + w_{1/2B}} \quad (16)$$

según se utilice la anchura de pico en la línea base ( $w$ ) o en la mitad de la altura de pico ( $w_{1/2}$ ), donde  $t_{mA}$  y  $t_{mB}$  son los tiempos de migración de dos picos adyacentes, siendo  $t_{mB} \geq t_{mA}$ .

- **Selectividad:** La selectividad se refiere a la separación que se consigue entre los ápices de dos picos correspondientes a dos solutos en un electroferograma.

En CE se ha incluido el concepto factor de separación ( $\alpha$ ) que viene dado por la expresión:

$$\alpha = \frac{(t_{mB} - t_0)}{(t_{mA} - t_0)} \quad (17)$$

donde  $t_0$  es el tiempo de migración de un soluto neutro, que viene determinado únicamente por la movilidad electrosmótica.

## **Introducción de muestra en electroforesis capilar**

El sistema de introducción de muestra debe ser capaz de introducir pequeños volúmenes de muestra, de forma eficiente y reproducible, teniendo en cuenta que:

- La longitud o espacio que ocupa la muestra dentro del capilar es un parámetro crítico. El ancho de banda de la muestra debe ser lo más estrecho posible, para minimizar el ensanchamiento de zona y evitar así pérdidas en la eficacia y resolución de la separación. Éste debe ser menor que el ancho de banda generado por difusión o por la ventana del detector. Normalmente introducciones mayores (en longitud) del 1% de la longitud de separación, afectan negativamente a la eficacia.
- Por otra parte, la fuerza iónica de la muestra introducida puede afectar de forma importante a la simetría de los picos y por lo tanto a la eficacia de la separación, debido a la diferencia de conductividad entre la zona de muestra y la zona del tampón. Para minimizar este efecto, la concentración de la muestra debe ser mucho menor que la concentración del tampón (unas 100 veces menor). Por otro lado, los co-iones del tampón (iones de la misma carga

que los solutos) deben presentar una movilidad electroforética similar a la de los solutos.

Los modos de introducción de muestra más empleados en electroforesis capilar son los de introducción directa de la muestra en la columna, mediante el establecimiento de una diferencia de presión entre los extremos del capilar (introducción hidrodinámica), o por electromigración (introducción electrocinética).

**Introducción hidrodinámica:** Se trata del modo más ampliamente utilizado. Puede llevarse a cabo por aplicación de presión en el extremo de introducción, mediante succión por vacío aplicado a la salida del capilar o bien por el efecto sifón obtenido por la elevación del vial de muestra con respecto al de destino (figura 7).

El volumen de muestra introducido es función de las dimensiones del capilar, de la viscosidad del tampón y del tiempo que se aplica la diferencia de presión. Este volumen, para la introducción por presión y succión, puede calcularse según la ecuación de *Poiseulle*:

$$V_i = \frac{\Delta P r_c^4 \pi}{8L\eta} \quad (18)$$

siendo,  $V_i$  [m<sup>3</sup>] el volumen de muestra introducido,  $\Delta P$  [Pa] la diferencia de presión entre los extremos del capilar,  $r_c$  [m] el radio interno del capilar,  $t$  [s] el tiempo de introducción,  $L$  [m] la longitud del capilar y  $\eta$  [Pa s] la viscosidad del tampón.

Para el cálculo del volumen introducido mediante efecto sifón (introducción hidrostática), se emplea la misma ecuación (expresión 18), y el término  $\Delta P$  es reemplazado por su equivalente gravitacional.

$$\Delta P = \rho g \Delta h \quad (19)$$

siendo  $\rho$  [kg m<sup>-3</sup>] la densidad del tampón,  $g$  la constante gravitacional (9.80668 N kg<sup>-1</sup>) y  $\Delta h$  [m] la diferencia de altura de los reservorios.

La introducción de muestra hidrodinámica proporciona muestras representativas de la composición de los analitos en la muestra. Los volúmenes de muestra introducidos dependen del tiempo de introducción, de las dimensiones del capilar y de la caída de presión en el capilar.

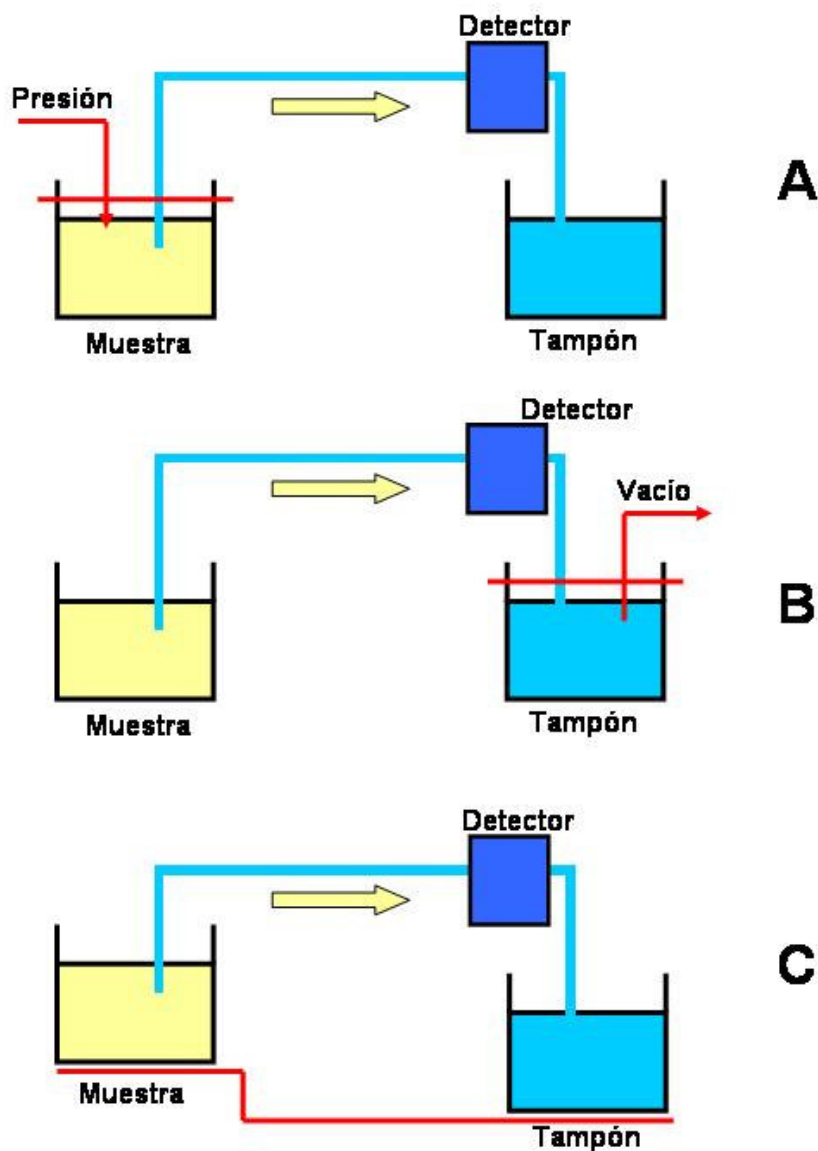


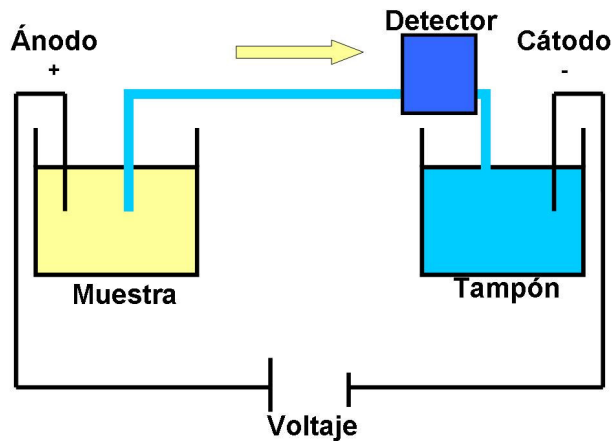
Figura 7.- Introducción de muestra hidrodinámica: por presión (A), por succión (B) y por efecto sifón (C).

**Introducción electrocinética:** Se lleva a cabo reemplazando el vial del tampón en el extremo de introducción por el vial de muestra y aplicando un voltaje durante un corto periodo de tiempo (figura 8). El analito entra en el capilar por migración electroforética y debido al bombeo del flujo electrosmótico (en el caso de que exista).

Una propiedad característica de este modo es que la cantidad de soluto introducida es dependiente de su movilidad electroforética y viene dada por:

$$Q_i = \frac{V\pi C_i t r_c^2 (\mu_{ep} + \mu_{eo})}{L} \quad (20)$$

siendo,  $Q_i$  [moles] la cantidad introducida de la especie  $i$ ,  $C_i$  [moles  $m^{-3}$ ] la concentración de la especie  $i$  en la muestra,  $t$  [s] el tiempo de aplicación del voltaje. El resto de parámetros han sido definidos anteriormente.



**Figura 8.- Introducción de muestra electrocinética.**

En este tipo de introducción se produce una discriminación de las especies iónicas, los iones con mayor movilidad, son introducidos en mayor proporción que los iones de menor movilidad. Además las variaciones de conductividad de las muestras introducidas provocan diferencias en el campo eléctrico y por tanto variaciones en la cantidad de muestra introducida. Debido a estos fenómenos, este modo de introducción es menos reproducible que el modo hidrodinámico.

### **Modos de electroforesis Capilar**

Existen diferentes modos de electroforesis capilar, lo que permiten su utilización para varios y diversos tipos de muestras y analitos, siendo los más importantes:

- **Electroforesis capilar de zona libre (CZE):** Es el modo más empleado en electroforesis capilar gracias a su simplicidad y poder de separación. Sin embargo, tiene la limitación de ser útil sólo para la separación de especies cargadas, no permitiendo separar especies neutras.



En el interior del capilar sólo se encuentra el tampón que se emplea para llevar a cabo la separación, su composición es uniforme a lo largo de toda la región de separación. La muestra se introduce como una banda estrecha en el capilar, rodeada de la disolución tampón. Cuando se aplica un potencial a través de los extremos del capilar, los componentes iónicos se mueven de acuerdo con su propia movilidad. El mecanismo de separación se basa en las diferencias en la relación carga/tamaño de las diferentes sustancias que componen la muestra. Estas diferencias implican distintas movilidades electroforéticas y, por lo tanto, distintas velocidades de migración. La presencia de flujo electrosmótico permite la separación y detección de aniones y cationes en un solo análisis, siempre y cuando éste sea lo suficientemente elevado como para arrastrar los aniones al detector.

- **Cromatografía electrocinética capilar micelar (MEKC):** Fue desarrollada por *Terabe en 1984*<sup>78</sup>, en ella se combinan principios de la electroforesis capilar (flujo electrosmótico y movilidad electroforética) y de cromatografía (distribución entre fase móvil y estacionaria). Su característica principal es la inclusión de fases semiestacionarias, formadas mediante la adición de aditivos, generalmente tensioactivos en concentración superior a su concentración crítica micelar (CMC), al tampón de separación. Los tensioactivos son moléculas que poseen tanto carácter hidrofílico como hidrofóbico. Tienen una cabeza con grupos polares, que pueden ser aniónicos, catiónicos o neutros, y una cola hidrocarbonada no polar. La formación de las micelas es debida a su carácter hidrofóbico. Por encima de su CMC, las moléculas de tensioactivo se agrupan formando agregados esféricos denominadas micelas, en las cuales sus cabezas (extremos hidrofílicos) están orientadas hacia el exterior, interaccionando con el medio acuoso del tampón, mientras que sus colas (extremos hidrofóbicos) se orientan hacia el interior, formando un núcleo apolar.

El mecanismo de separación se basa en un proceso de reparto entre la fase micelar (que actúa como una pseudofase estacionaria) y el tampón acuoso. El analito, por tanto, se distribuirá entre la fase micelar y la disolución tampón en base a su hidrofobicidad y eluirá dependiendo de su coeficiente de distribución entre ambas fases. Las moléculas neutras muy polares se encontrarán siempre en la fase acuosa, y se moverán a la velocidad del flujo

electrosmótico, mientras que los compuestos muy hidrófobos permanecerán todo el tiempo dentro de la micela y migrarán con ella.

El uso principal de este modo de electroforesis es la separación de compuestos neutros que no pueden ser separados mediante CZE.

- **Electroforesis capilar de geles (CGE):** Este modo de electroforesis se ha desarrollado para la separación de compuestos con parecida relación carga/tamaño y elevado tamaño, los cuales no pueden ser separados utilizando CZE, como son el ADN, las proteínas o los ácidos nucleicos.

Se basa en el movimiento neto de los analitos a través de un entramado molecular formado por los geles o tamices moleculares que rellenan el capilar, bajo el campo eléctrico aplicado.

- **Isotacoforesis capilar (CITP):** La separación se produce mediante la combinación de dos disoluciones tampón entre las cuales se sitúa la muestra, migrando los solutos a una velocidad constante.

Este modo se emplea habitualmente para la separación de sustancias iónicas aunque no es posible la separación de cationes y aniones en un solo análisis. También se utiliza como método de preconcentración previo a otros modos de electroforesis.

- **Isoelectroenfoque capilar (CIEF):** El mecanismo de separación se basa en los diferentes puntos isoeléctricos (pI) de los solutos a separar, utilizando para ello una mezcla de anfóteros con capacidad tampón a distintos pI. Ha sido ampliamente aplicado a la separación de proteínas, péptidos y aminoácidos.
- **Electrocromatografía capilar (ECC):** Este modo es un híbrido entre HPLC y CE. Los capilares de sílice se empaquetan con las fases estacionarias típicas de HPLC aplicándose un voltaje a través del capilar empaquetado que genera un flujo electrosmótico. La separación de los analitos neutros se basa en fenómenos de reparto entre la fase móvil y la fase estacionaria. La separación de analitos cargados se basa en los fenómenos de reparto y en la migración diferencial de los analitos.

## **Sistemas de detección en Electroforesis Capilar**

La principal limitación encontrada hasta el momento en electroforesis capilar ha sido su posibilidad de acoplamiento a los diferentes sistemas de detección, debido a las pequeñas dimensiones del capilar utilizado, y a los exiguos volúmenes de muestra<sup>79</sup>.

De forma general, cuando se acopla un detector a un sistema de separación, éste debe cumplir una serie de condiciones para el buen funcionamiento global, como son:

- Su respuesta debe ser rápida ante un cambio en la concentración del analito.
- Su sensibilidad debe ser lo más alta posible, proporcionando cambios en su señal ante mínimas variaciones en la concentración o masa del analito.
- Su presencia, no debe perjudicar la eficacia de la separación.
- Idealmente, la señal debe ser nula en ausencia de analito, aunque en la práctica todos los detectores registran en estas condiciones señales conocidas como señal de fondo o ruido. Por lo tanto, la señal de fondo no debe perturbar la correspondiente a los analitos y conviene que sea lo más pequeña y constante posible, buscando siempre las condiciones para que la relación entre la señal analítica y el ruido sea máxima.
- Debe proporcionar señales fiables. Esto implica principalmente que estas señales deben ser reproducibles y estables en el tiempo.
- Debe presentar un amplio intervalo lineal, proporcionando cambios en su señal en el margen más amplio posible de concentración o masas del analito, siendo la relación entre la señal y la concentración lineal.
- Debe proporcionar límites de detección bajos. Para ello es necesaria la combinación de una alta sensibilidad con una baja fluctuación en la señal de fondo.

Hasta el momento, se han adaptado prácticamente todas las técnicas de detección a la electroforesis capilar con diferente éxito. En la tabla 4 se recogen a modo de resumen las distintas técnicas empleadas con los límites de detección alcanzados cuando han sido acopladas a equipos de electroforesis capilar.

Tabla 4.- Técnicas de detección en electroforesis capilar<sup>79</sup>

Sistema de detección		Límite de detección (mol L <sup>-1</sup> )
<b>Técnicas ópticas</b>		
Absorción UV-Visible	Directa	10 <sup>-5</sup> – 10 <sup>-7</sup>
	Indirecta	10 <sup>-4</sup> – 10 <sup>-6</sup>
	Con paso óptico aumentado	10 <sup>-7</sup>
Fluorescencia	Directa	10 <sup>-7</sup> – 10 <sup>-9</sup>
	Indirecta	10 <sup>-6</sup> - 10 <sup>-8</sup>
	Inducida por láser directa	10 <sup>-10</sup> - 10 <sup>-13</sup>
	Inducida por láser indirecta	10 <sup>-5</sup> – 10 <sup>-7</sup>
Fosforescencia a temperatura ambiente en estado líquido		10 <sup>-6</sup> – 10 <sup>-8</sup>
Quimioluminiscencia		10 <sup>-5</sup> – 10 <sup>-11</sup>
Termoóptico		10 <sup>-7</sup> - 10 <sup>-8</sup>
Índice de refracción		10 <sup>-5</sup> – 10 <sup>-7</sup>
Espectroscopía Raman		10 <sup>-3</sup> – 10 <sup>-7</sup>
<b>Técnicas electroquímicas</b>		
Conductimetría		10 <sup>-7</sup> - 10 <sup>-8</sup>
Potenciometría		10 <sup>-7</sup> – 10 <sup>-8</sup>
Amperometría		10 <sup>-7</sup> – 10 <sup>-9</sup>
<b>Otras técnicas</b>		
Espectrometría de masas		10 <sup>-7</sup> – 10 <sup>-9</sup>
Radiométricos		10 <sup>-10</sup> – 10 <sup>-11</sup>

**4.1 SEPARACIÓN Y DETERMINACIÓN DE  
AMITROL E HIDROXIATRAZINA POR  
ELECTROFORESIS CAPILAR DE ZONA CON  
DETECCIÓN UV**



En el presente capítulo se desarrolla la puesta a punto de una metodología analítica para la separación y determinación de amitrol e hidroxiatrazina por electroforesis capilar de zona con detección UV.

La espectrofotometría UV/Visible es la técnica de detección más ampliamente utilizada en electroforesis capilar. La mayoría de los instrumentos comerciales vienen equipados con un detector UV/Visible. Este tipo de detector es estable, fácil de usar y permite la detección en la propia columna (*“on-column”*).

La mayor desventaja en electroforesis capilar de este detector radica en su relativamente baja sensibilidad en el análisis a nivel de trazas. Teniendo en cuenta la ecuación de *Lambert-Beer*:

$$A = \varepsilon b C . (21)$$

donde *A* es la absorbancia a una longitud de onda fija, *b* [cm] es la longitud del paso óptico,  $\varepsilon$  [ $L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ], es la absortividad molar de la especie química, y *C* [ $\text{mol L}^{-1}$ ] es la concentración de la especie química<sup>79</sup>.

La absorbancia de una especie química, a una concentración determinada y una longitud de onda fija es directamente proporcional a la longitud del paso óptico, que se corresponde con el ancho de la celda de detección.

En electroforesis capilar, la celda de detección es el propio capilar, con un paso óptico igual al diámetro interno del mismo, cuyo valor habitual es de 75  $\mu\text{m}$ . Este hecho, unido a los pequeños volúmenes de muestra introducidos (del orden de los nL), compromete la sensibilidad que pueda alcanzarse empleando la detección espectrofotométrica.

### 4.1.1 ENSAYOS PREVIOS

#### A. Elección del modo de electroforesis

Para la selección del modo de electroforesis capilar hay que tener en cuenta que el amitrol y la hidroxiatrazina presentan propiedades ácido base. En la tabla 5 se muestran los  $pK_a$  de ambos compuestos. El amitrol se encuentra protonado a valores de pH por debajo de 4.2, neutro para valores de pH entre 4.2 y 10.5 y cargado negativamente para valores de pH por encima de 10.5. La hidroxiatrazina se encuentra protonada a valores inferiores a 5.15 y neutra a valores superiores a ésta.

Tabla 5.-  $pK_a$  de amitrol e hidroxiatrazina

	$pK_a$	Referencia
<b>Amitrol</b>	1.6, 4.2 y 10.5	48
<b>hidroxiatrazina</b>	5.15	68

En la figura 9 se muestra el diagrama de fracciones molares de cada uno de los compuestos. En ellos, se observa, que a pH ácidos ambos compuestos se encuentran cargados positivamente, por lo que es posible llevar a cabo su separación por electroforesis capilar de zona.

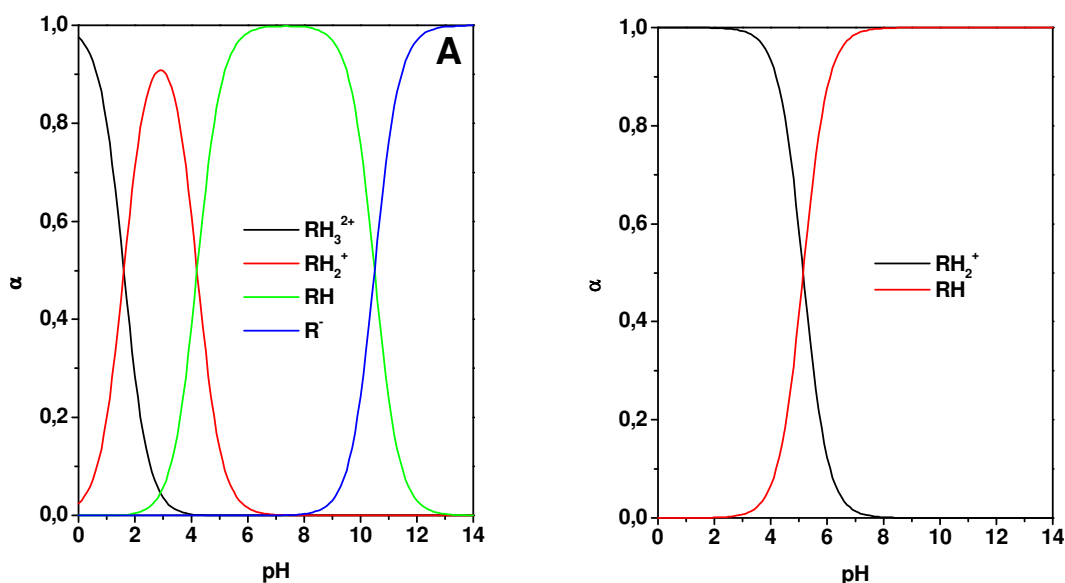


Figura 9.- Diagrama de fracciones molares de amitrol (A) e hidroxiatrazina (B).



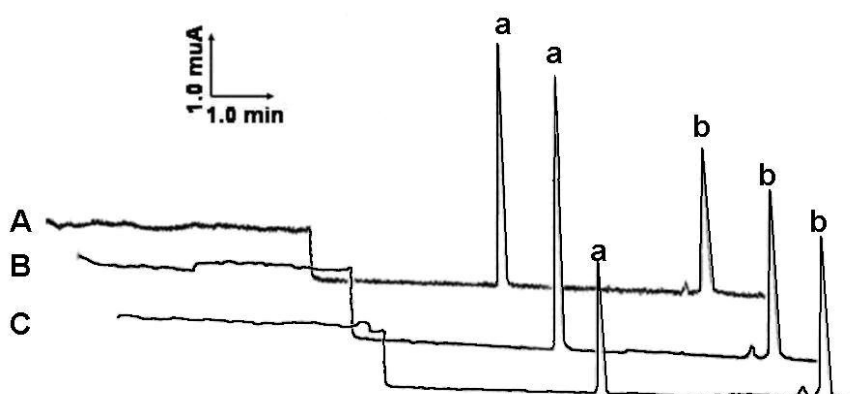
## B. Elección de la longitud de onda

Antes de iniciar la optimización de una metodología analítica en la cual se emplea la detección UV, es necesario conocer la longitud de onda de detección que se va a fijar, ésta se corresponde con la de los máximos de absorción de los compuestos a determinar.

El amitrol y la hidroxiatrazina presentan absorción en el UV<sup>48,59,80</sup>. El amitrol, presenta absorción a longitudes de onda cercanas a 200 nm<sup>48,59</sup>, pero ésta es muy pobre, de hecho, en algunos trabajos publicados donde se emplea la detección UV para su determinación, el herbicida es previamente derivatizado con el objetivo de aumentar la sensibilidad del método<sup>41,42</sup>. Por otro lado, la hidroxiatrazina presenta una única banda de absorción que se encuentra alrededor de 215 nm<sup>80</sup>.

Para seleccionar la longitud de onda, se realizan diferentes análisis utilizando disoluciones de los herbicidas en concentración de 3.0 mg L<sup>-1</sup>, variando la longitud de onda de detección entre 190 y 210 nm, empleando como electrolito de separación, tampón fosfato 0.010 mol L<sup>-1</sup> de pH 2.2. El voltaje de separación aplicado es de 25.0 kV y la introducción de muestra se realiza en modo hidrodinámico durante 2.00 s.

En la figura 10 se muestra los electroferogramas obtenidos.



**Figura 10.- Electroferogramas a diferentes longitudes de onda: 190 nm (A), 200 nm (B) 210 nm (C). Amitrol (a) e hidroxiatrazina (b) en concentración 3.0 mg L<sup>-1</sup>. Tampón de separación: fosfato 0.010 mol L<sup>-1</sup> de pH 2.2; introducción de muestra de modo hidrodinámico 2.00 s; voltaje aplicado: 25.0 kV.**

En estos electroferogramas se observan dos picos, el primero de ellos corresponde al amitrol que presenta mayor relación carga/tamaño y el segundo a la hidroxiatrazina.

En base a los resultados obtenidos, se elige como longitud de onda de detección óptima 200 nm, ya que es donde se obtiene una mayor sensibilidad en ambos casos.

#### 4.1.2 ELECCIÓN DEL ELECTROLITO DE SEPARACIÓN

La disolución tampón, como medio electrolítico, juega un papel muy importante en electroforesis capilar puesto que su naturaleza, pH y concentración, afectan considerablemente a la selectividad y eficacia de la separación. Por ello, es necesaria la optimización de cada una de estas características del medio.

##### A. Influencia del pH

*La velocidad de migración de los analitos en el interior de la columna capilar depende, entre otros, del pH del tampón de separación, ya que éste influye tanto en la movilidad electroforética de los analitos, como en la electrosmótica.*

*Cuando los analitos presentan propiedades ácido/base, el pH del medio influye en el grado de ionización de éstos y por lo tanto en su movilidad electroforética, ya que ésta es proporcional a la carga neta de las especies. Por otro lado, el grado de disociación de los grupos silanoles (Si-OH) de la pared del capilar depende del pH, por lo que la movilidad electrosmótica también va a depender del pH.*

*Como consecuencia de todo lo anterior, el pH del medio afecta a la selectividad, resolución y eficacia del sistema objeto de estudio.*

Se estudia la influencia del pH del medio para valores de pH comprendidos entre 2.0 y 4.0, utilizando disoluciones de amitrol e hidroxiatrazina en concentración  $3.0 \text{ mg L}^{-1}$ .

Se preparan disoluciones de tampón citrato  $0.010 \text{ mol L}^{-1}$  de diferentes valores de pH. Se registran los electroferogramas de separación utilizando como tampón de separación cada una de las disoluciones preparadas. El voltaje de separación aplicado es de 25.0 kV y la introducción de muestra se realiza de modo hidrodinámico durante 2.00 s.

En la figura 11 se muestran los electroferogramas obtenidos y en la tabla 6 se recogen los tiempos de migración, áreas y alturas de pico, junto con el número de platos teóricos calculados.

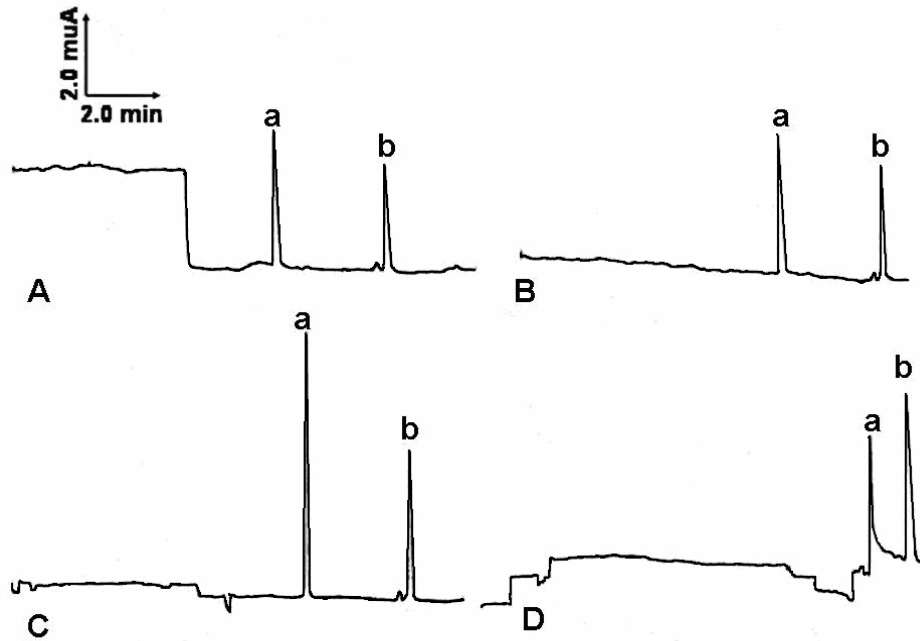


Figura 11.- Electroferogramas en tampón citrato  $0.010 \text{ mol L}^{-1}$  ajustado a diferentes pH: 2,0 (A); 2,6 (B); 3,2 (C); 4,0 (D). Amitrol (a) e hidroxiatrazina (b) en concentración  $3.0 \text{ mg L}^{-1}$ . Voltaje de separación: 25.0 kV; introducción de muestra hidrodinámica durante 2.00 s, longitud de onda de detección: 200 nm.

Los tiempos de migración del amitrol aumentan para valores de pH superiores a 2.6, permaneciendo prácticamente constantes los de la hidroxiatrazina en todo el margen de pH estudiado. Este comportamiento es lógico si tenemos en cuenta los valores de  $pK_a$  de ambos compuestos (tabla 5) y que la movilidad del flujo electrosmótico en el margen de pH estudiado, es muy baja, prácticamente despreciable frente a las movilidades electroforéticas de los analitos.

Dado que a pH 3.2 se obtiene una buena sensibilidad y eficacia en el caso del amitrol y resultados similares para el caso de la hidroxiatrazina, se elige un valor de pH 3.2 para estudios posteriores.

Tabla 6.-Influencia del pH del tampón de separación.

pH	Compuesto (3.0 mg L <sup>-1</sup> )	Tiempo de migración (minutos)	Altura de pico (muA)	Área de pico (muA x s)	Número de platos teóricos
2.0	amitrol	6.8	3,3	22	2,3 x 10 <sup>4</sup>
	hidroxiatrazina	9.8	2,7	16	6,1 x 10 <sup>4</sup>
2.2	amitrol	6.6	3,3	22	2,4 x 10 <sup>4</sup>
	hidroxiatrazina	9.6	2,8	16	6,3 x 10 <sup>4</sup>
2.4	amitrol	6.5	3,4	21	2,4 x 10 <sup>4</sup>
	hidroxiatrazina	9.3	2,8	16	6,5 x 10 <sup>4</sup>
2.6	amitrol	6.5	3,4	20	2,5 x 10 <sup>4</sup>
	hidroxiatrazina	9.0	2,8	15	6,7 x 10 <sup>4</sup>
2.8	amitrol	6.89	4,6	21	5.0 x 10 <sup>4</sup>
	hidroxiatrazina	9.5	3,1	16	8.6 x 10 <sup>4</sup>
3.0	amitrol	7.1	6,1	22	8,9 x 10 <sup>4</sup>
	hidroxiatrazina	9.6	3,5	16	1.1 x 10 <sup>5</sup>
3.2	amitrol	7.7	6,7	23	1.1 x 10 <sup>5</sup>
	hidroxiatrazina	10.3	3,8	17	1.4 x 10 <sup>5</sup>
3.4	amitrol	8.2	5,2	25	7.7 x 10 <sup>4</sup>
	hidroxiatrazina	10.7	4,0	18	1.5 x 10 <sup>5</sup>
3.6	amitrol	8.7	4,3	21	6.5 x 10 <sup>4</sup>
	hidroxiatrazina	10.3	4,0	21	1.4 x 10 <sup>5</sup>
3.8	amitrol	9.0	3,2	18	5.3 x 10 <sup>4</sup>
	hidroxiatrazina	10.1	3,8	26	1.3 x 10 <sup>5</sup>
4.0	amitrol	9.9	2,8	17	3.7 x 10 <sup>4</sup>
	hidroxiatrazina	10.0	3,6	29	1.3 x 10 <sup>5</sup>

Los datos son el resultado de la media de tres análisis.

## B. Influencia de la naturaleza del tampón de separación

A la hora de seleccionar los tampones adecuados para la realización de este estudio, hay que tener en cuenta los siguientes factores:

- Que posean una elevada capacidad de tamponamiento al pH de trabajo.
- Que tengan baja conductancia, evitando así intensidades de corriente elevadas y por tanto la generación de calor en el interior de la columna capilar.

Al pH de separación óptimo elegido, pH 3.2, se ensaya con disoluciones tampón de diferente naturaleza: fosfato, citrato, ftalato y oxalato en concentración  $0.010 \text{ mol L}^{-1}$ . El estudio se realiza bajo las mismas condiciones de separación que el estudio anterior.

En el caso de los tampones ftalato y oxalato, no es posible llevar a cabo el análisis, debido a que la corriente de separación es elevada y no es posible obtener una línea base estable.

La figura 12 muestra los electroferogramas obtenidos empleando tampón fosfato y citrato.

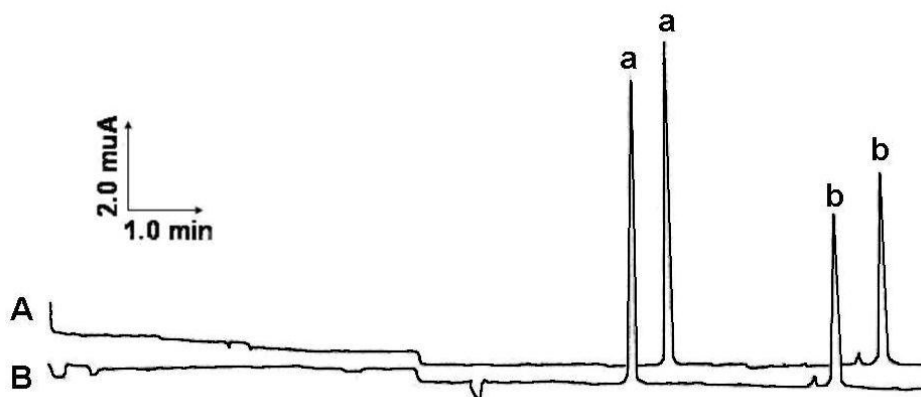


Figura 12.- Electroferogramas en tampón fosfato (A) y citrato (B) en concentración  $0.010 \text{ mol L}^{-1}$  de pH 3,2. Amitrol (a) e hidroxiatrazina (b)  $3.0 \text{ mg L}^{-1}$ . Resto de condiciones igual que en figura 11.

A la vista de estos resultados, se elige tampón fosfato como electrolito más adecuado para realizar el estudio electroforético. El tiempo de análisis es ligeramente superior, pero la

altura y área de pico de ambos compuestos y la eficacia de la separación, son más altos en este tampón

### C. Influencia de la concentración

*La concentración de la disolución tampón tiene efectos muy importantes en la movilidad de los solutos en electroforesis capilar. Afectando a la movilidad electroforética ( $\mu_{ep}$ ) y a la electroosmótica ( $\mu_{eo}$ ).*

*Wieme<sup>81</sup> propuso una expresión matemática, derivada de la teoría de Debye-Hückel, que relaciona la movilidad electroforética y/o electroosmótica con la concentración del electrolito de separación:*

$$\mu_{ep}\mu_{eo} = \frac{3 \times 10^{-8} Z}{\eta \sqrt{c}} \quad (22)$$

*siendo, Z la carga efectiva del ión,  $\eta$  la viscosidad y c la concentración de la disolución tampón.*

*A partir de esta fórmula se deduce que tanto la movilidad electroforética como la electroosmótica son inversamente proporcionales a la raíz cuadrada de la concentración del electrolito. En la práctica y en ciertas ocasiones esto puede no ser del todo cierto.*

El estudio de la influencia de la concentración del electrolito de separación, se lleva a cabo utilizando disoluciones de amitrol e hidroxiatrazina en concentración 3.0 mg L<sup>-1</sup>. Se registran los electroferogramas de separación en medio tampón fosfato de pH 3,2 en concentraciones comprendidas entre 0.005 y 0.050 mol L<sup>-1</sup>, bajo las mismas condiciones de separación que el estudio anterior.

En la figura 13 se muestran algunos de los electroferogramas obtenidos. Puede observarse, que el aumento en la concentración del tampón de separación causa un considerable aumento en los tiempos de migración de ambos herbicidas. La representación de los tiempos de migración frente a la raíz cuadrada de la concentración de tampón, es lineal para todo el rango de concentraciones estudiado, como muestra la figura 14. Esta relación lineal establecida por **Atamna y col<sup>82</sup>** se cumple cuando las condiciones electroforéticas son ideales.

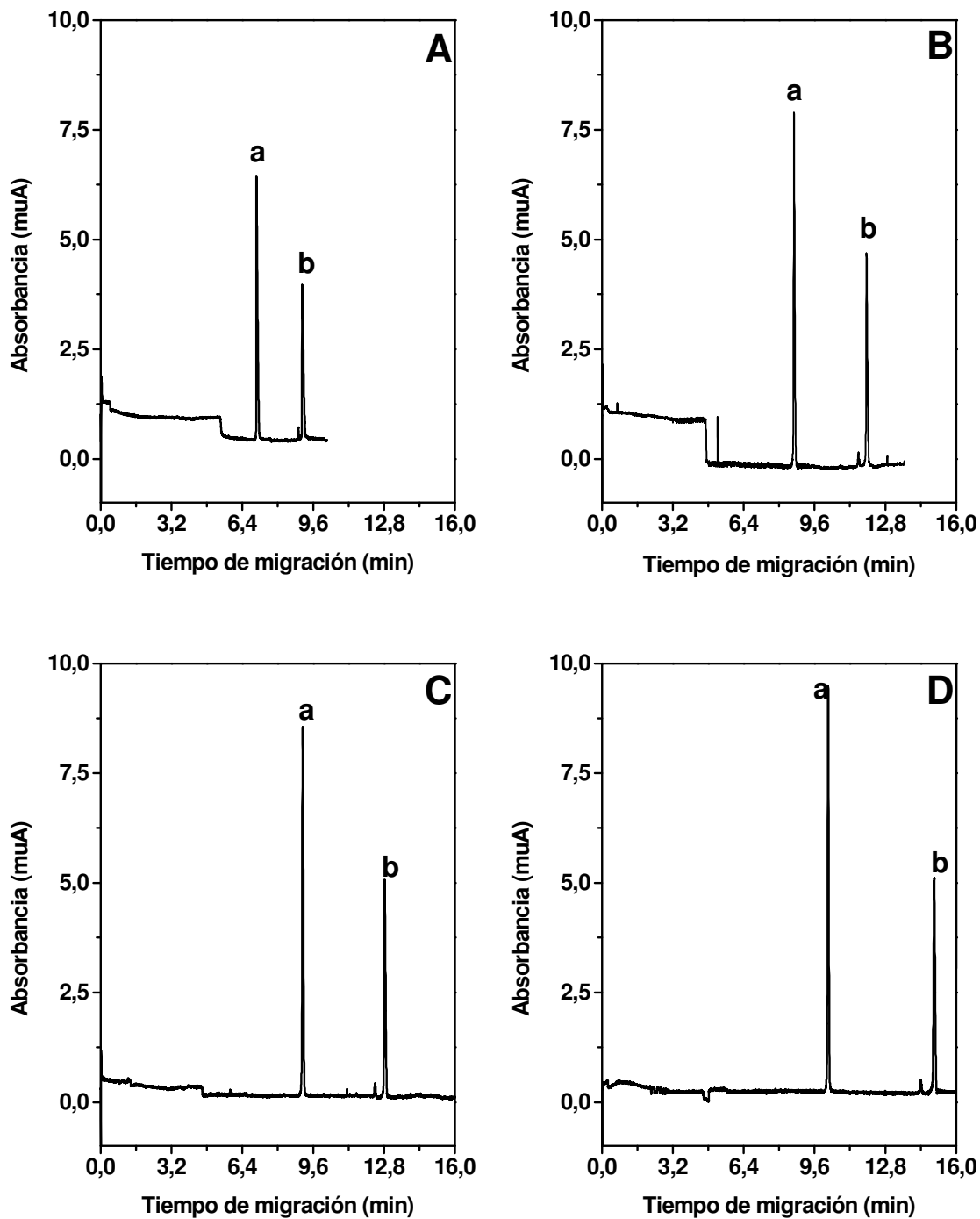


Figura 13.- Electroferogramas a diferentes concentraciones del tampón fosfato de pH 3.2: 0.005 (A), 0.020 (B), 0.030 (C) y 0.050 mol L<sup>-1</sup> (D). Amitrol (a) e hidroxiatrazina (b) 3.0 mg L<sup>-1</sup>. Resto de condiciones igual que en figura 11.



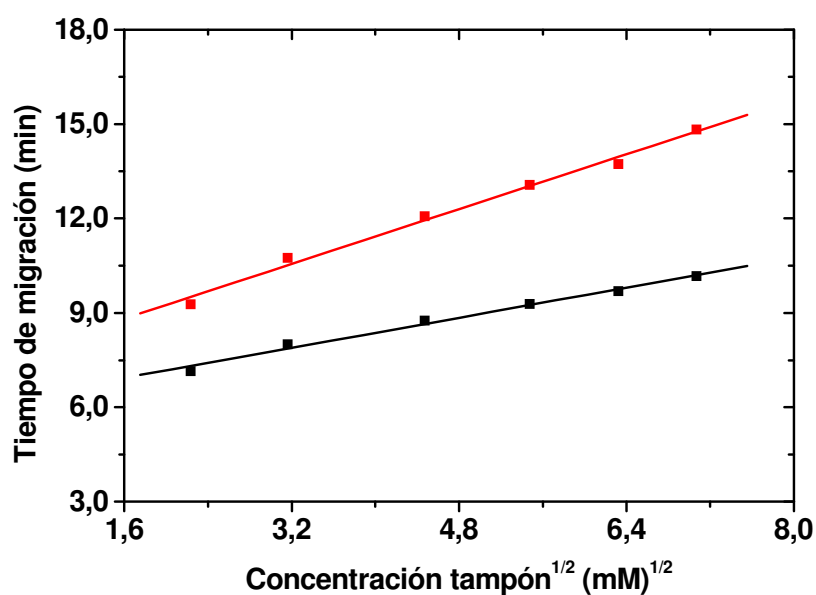


Figura 14.- Variación del tiempo de migración con la raíz cuadrada de la concentración del tampón de separación, para amitrol (■) e hidroxiatrazina (■). Resto de condiciones como en figura 13.

Bajo las condiciones estudiadas, la señal analítica (altura y área de pico) y la eficacia de la separación aumentan al aumentar el valor de la concentración del tampón. El valor final de concentración óptima se elige como un compromiso entre sensibilidad y tiempo de análisis. Dicho valor se fija en  $0.020 \text{ mol L}^{-1}$ .

### 4.1.3 INFLUENCIA DEL VOLTAJE DE SEPARACIÓN

*En electroforesis capilar, el voltaje de separación afecta en gran medida al tiempo de análisis y a la eficacia de la separación. El incremento del voltaje de separación aumenta la velocidad del flujo electrosmótico, reduciendo por tanto los tiempos de análisis a la vez que mejora la eficacia del sistema. Este hecho, sugiere trabajar siempre a voltajes altos. Sin embargo y dado que el calor producido es proporcional a la potencia,  $P$  [W], la cual viene dada por:*

$$P = VI \quad (23)$$

*donde,  $V$  [V] es voltaje e  $I$  [A] intensidad de corriente, al aumentar el voltaje, aumenta la potencia, y por lo tanto la producción de calor. Si este calor no es disipado rápidamente, la temperatura en el interior del capilar aumentara dando lugar a una disminución de la viscosidad de la disolución tampón, lo que permitirá que la corriente fluya mas fácilmente. El aumento excesivo del calor dará lugar a: ensanchamiento de los picos, tiempos de migración no reproducibles, posible descomposición o desnaturalización de la muestra e incluso puede que la disolución tampón llegue a hervir, provocando la discontinuidad eléctrica a través del capilar, lo cual deteriora el sistema electrolítico.*

*Se debe elegir por tanto, un voltaje de separación que proporcione tiempos de análisis cortos y alta eficacia, sin que se llegue a producir un exceso de calor que no pueda ser disipado.*

*El voltaje máximo que debe emplearse para unas condiciones óptimas se puede determinar a través de la expresión de la ley de Ohm:*

$$V = I R \quad (24)$$

*La representación gráfica de la intensidad de corriente frente al voltaje aplicado, debe ser lineal. Cuando hay una producción excesiva de calor, la resistencia disminuye, dando lugar a un aumento de la corriente, produciéndose una desviación de esta linealidad. El voltaje máximo que se puede utilizar coincide con el punto en el cual se produce esta desviación y va a depender de la naturaleza, pH y concentración de la disolución tampón.*

Se estudia la influencia del voltaje de separación en la respuesta electroforética de amitrol e hidroxiatrazina, utilizando disoluciones de los herbicidas de  $3.0 \text{ mg L}^{-1}$ . Se emplea como electrolito de separación tampón fosfato  $0.020 \text{ mol L}^{-1}$  de pH 3.2 y se realiza el estudio bajo las mismas condiciones de separación que el estudio anterior. En la figura 15 se recogen algunos de los electroferogramas obtenidos.

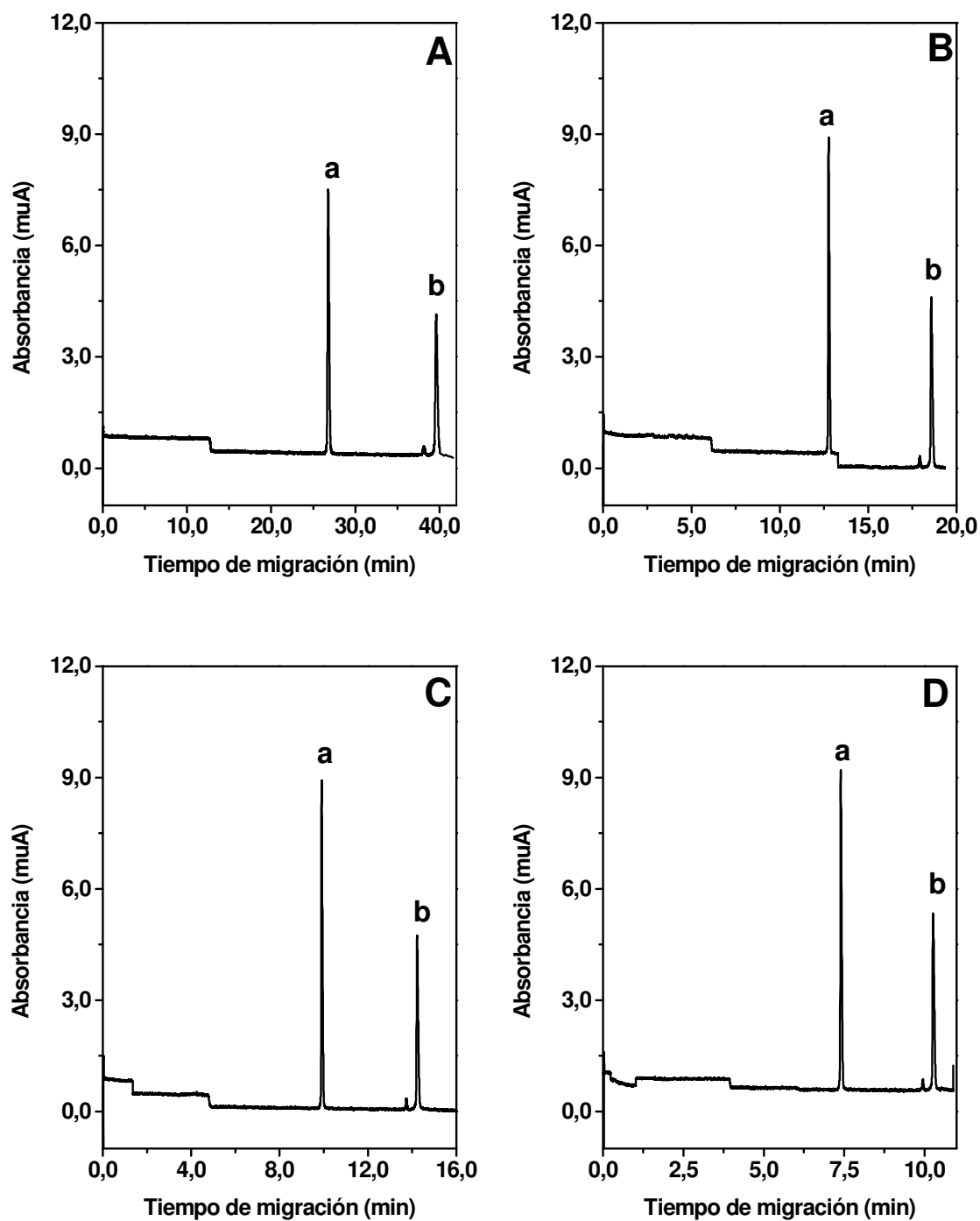


Figura 15.- Electroferogramas a diferentes voltajes de separación: 10.0 (A), 20.0 (B), 25.0 (C) y 30.0 kV (D). Amitrol (a) e hidroxiatrazina (b) en concentración  $3.0 \text{ mg L}^{-1}$ . Tampón de separación: fosfato  $0.020 \text{ mol L}^{-1}$  de pH 3.2; introducción de muestra hidrodinámica durante 2.00 s; longitud de onda de detección: 200 nm.

La figura 16 muestra la evolución de los tiempos de migración, altura y área de los picos y eficacia de la separación con el voltaje aplicado, para amitrol e hidroxiatrazina.

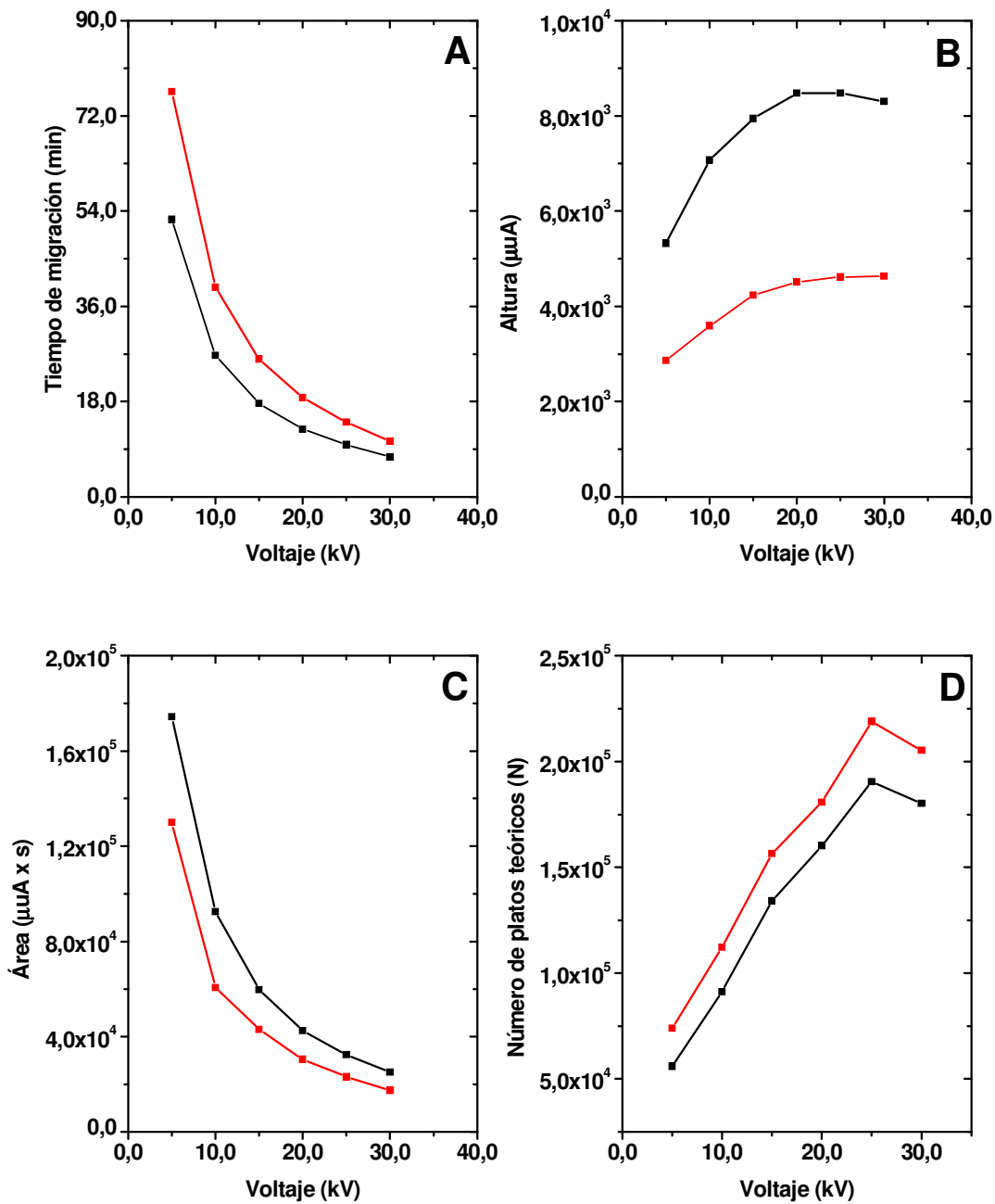


Figura 16.- Evolución del tiempo de migración (A), altura de pico (B), área de pico (C) y número de platos teóricos (D) con el voltaje aplicado durante la separación, para amitrol (■) e hidroxiatrazina (■). Resto de condiciones igual que en figura 15.

Puede observarse que al aumentar el voltaje, los tiempos de migración disminuyen, las alturas de los picos aumentan hasta 15.0 kV, el área de los picos disminuye porque disminuye la anchura de los picos y la eficacia de la separación (N), aumenta.

La figura 17 muestra la representación gráfica de la ley de Ohm.

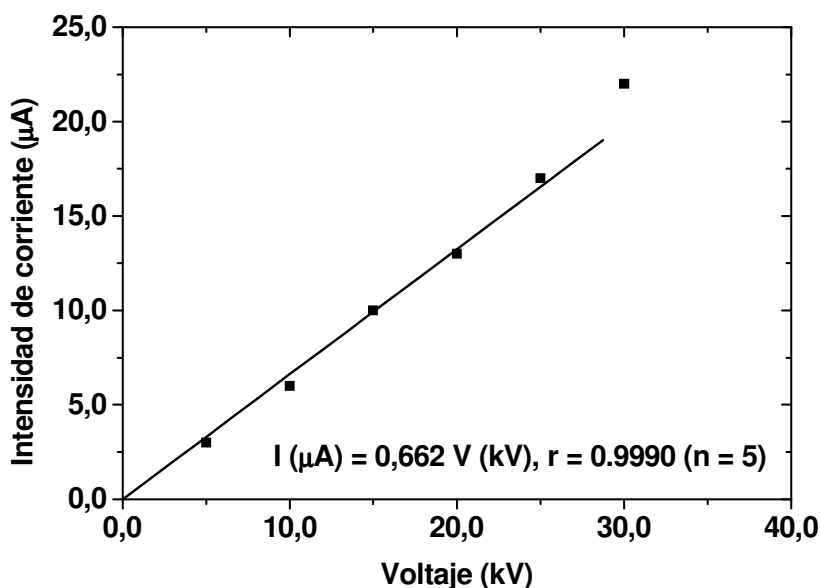


Figura 17.- Representación gráfica de la ley de Ohm. Condiciones iguales que en figura 15.

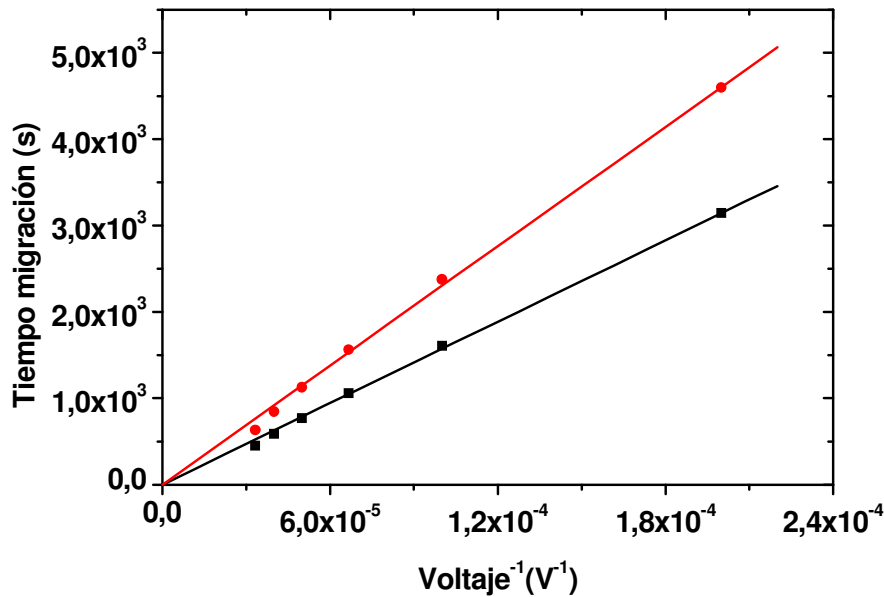
Como puede deducirse de esta figura, el voltaje de separación máximo, bajo las condiciones de separación estudiadas es 25.0 kV. Voltajes superiores a éste, muestran una pérdida de linealidad y por tanto el no cumplimiento de la ley de Ohm.

Se elige un voltaje de separación de 25.0 kV para la realización de estudios posteriores.

De la expresión 7 (pág 54), se deduce que de la representación gráfica del tiempo de migración frente al inverso del voltaje aplicado, se puede obtener información de los valores de las movilidades aparentes de los analitos objeto de estudio, conocidas las longitudes efectiva y total de la columna capilar.

En la figura 18, se han representado los tiempos de migración de amitrol e hidroxiatrazina frente al inverso del voltaje aplicado, obteniéndose una relación lineal en

ambos casos. Las ecuaciones de las rectas obtenidas, así como las movilidades aparentes de ambos compuestos quedan reflejadas en la tabla 7.



**Figura 18.- Variación del tiempo de migración con el inverso del voltaje de separación, para amitrol (■) e hidroxiatrazina (■).** Condiciones como en figura 15.

Tabla 7.- Evolución del tiempo de migración con el voltaje de separación y valor de las movilidades aparentes obtenidas para los compuestos objeto de análisis.

Compuesto	Ecuación de la recta, r, n	Movilidad aparente ( $\mu_{eo} + \mu_{ep}$ ) ( $\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ )
<b>Amitrol</b>	$t_m \text{ (s)} = (1.6 \pm 0.2) \times 10^7 \text{ 1/V (V}^{-1}\text{)},$ $r = 0.9995, n = 6$	$4.1 \times 10^{-4}$
<b>Hidroxiatrazina</b>	$t_m \text{ (s)} = (2.3 \pm 0.3) \times 10^7 \text{ 1/V (V}^{-1}\text{)},$ $r = 0.9990, n = 6$	$2.8 \times 10^{-4}$

Longitud total y efectiva de la columna: 100 y 65 cm, respectivamente.

A partir del estudio de la influencia del voltaje de separación es posible evaluar el coeficiente de difusión de los compuestos. La eficacia de la separación expresada como el número de platos teóricos, es directamente proporcional al voltaje aplicado. A partir de la expresión de la eficacia (expresión 11, pág 55), y del valor de la movilidad aparente de los compuestos calculada anteriormente, es posible estimar el coeficiente de difusión ( $D$ ).

De la representación gráfica del número de platos teóricos ( $N$ ) frente al voltaje aplicado ( $V$ ) se obtienen relaciones lineales para el amitrol y para la hidroxiatrazina a voltajes comprendidos entre 5.0 y 25.0 kV. Las ecuaciones de las rectas son las siguientes:

**amitrol:**  $N = (8.1 \pm 0.3) V (V), \quad r = 0.996, n = 5$

**hidroxiatrazina:**  $N = (9.4 \pm 0.5) V (V), \quad r = 0.997, n = 5$

A partir de la pendiente se determina el coeficiente de difusión de los compuestos:

**Coeficiente de difusión del amitrol:**  $2.5 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ .

**Coeficiente de difusión de hidroxiatrazina:**  $1.5 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ .

#### **4.1.4 ESTUDIOS DE INTRODUCCIÓN DE MUESTRA**

Una de las principales ventajas de la electroforesis capilar es que se necesitan unos volúmenes de muestra muy pequeños, de los cuales solo unos pocos nL se introducen en el capilar. Al trabajar con volúmenes tan pequeños, la introducción de la muestra es crucial desde el punto de vista cuantitativo, pues la reproducibilidad en el área y en la altura de los picos depende de la precisión con la que se realice ésta. Además, el volumen introducido en el capilar afecta directamente a la eficacia y a la resolución de la separación, puesto que al aumentar el volumen de muestra, aumenta la anchura de los picos disminuyendo así la eficacia y la resolución del sistema.

Como ya se ha comentado, en electroforesis capilar, existen dos modos de introducir la muestra en el interior de la columna capilar: modo hidrodinámico y modo electrocinético.

En este trabajo se ha estudiado la influencia del modo de introducción de muestra en la respuesta electroforética de amitrol e hidroxiatrazina, empleando la introducción hidrodinámica por vacío y la introducción de muestra electrocinética. En cada caso, se ha evaluado la reproducibilidad de la señal electroforética de ambos compuestos.

##### **A. Introducción hidrodinámica**

La introducción de muestra hidrodinámica se realiza aplicando una presión negativa en el vial destino durante un tiempo determinado. Se estudia la influencia de este tiempo en la señal electroforética de los compuestos para dos concentraciones diferentes 0.5 y 3.0 mg L<sup>-1</sup> de éstos, usando como tampón de separación fosfato 0.020 mol L<sup>-1</sup> de pH 3.2, aplicando un voltaje de 25.0 kV.

En la figura 19 se muestran los electroferogramas obtenidos para una concentración de 3.0 mg L<sup>-1</sup> en ambos compuestos.

Las figuras 20 y 21 muestran la evolución de la señal analítica (área y altura de pico) y de la eficacia de la separación, con el tiempo de introducción de muestra para una concentración de los herbicidas de 0.5 y 3.0 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente.



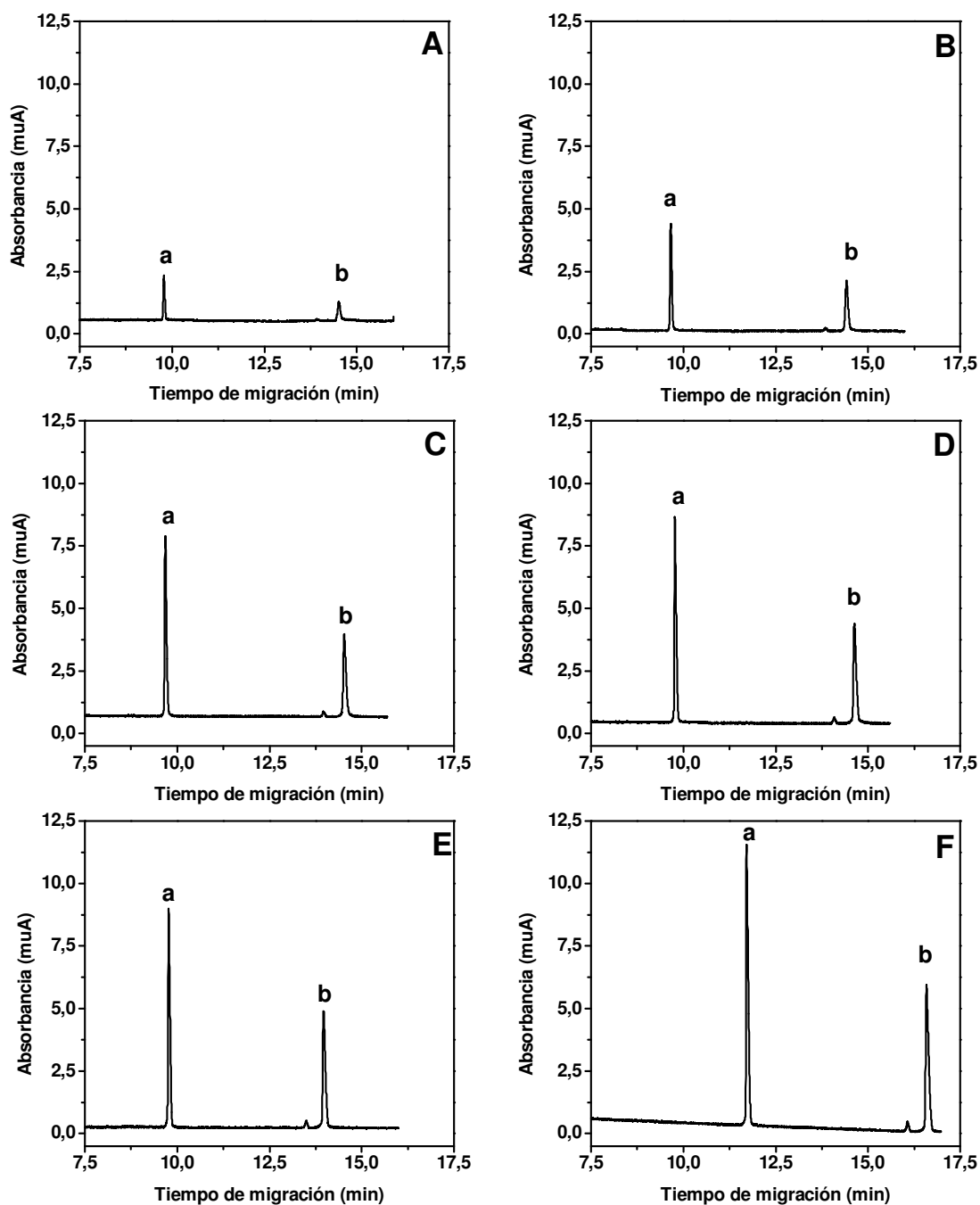


Figura 19.- Introducción de muestra hidrodinámica a diferentes tiempos: 0.50 (A), 1.00 (B), 1.50 (C), 1.75 (D), 2.00 (E) y 3.00 s (F). Amitrol (a) e hidroxiatrazina (b) en concentración  $3.0 \text{ mg L}^{-1}$ . Tampón de separación: fosfato  $0.020 \text{ mol L}^{-1}$  de pH 3.2; voltaje: 25.0 kV; longitud de onda de detección: 200 nm.

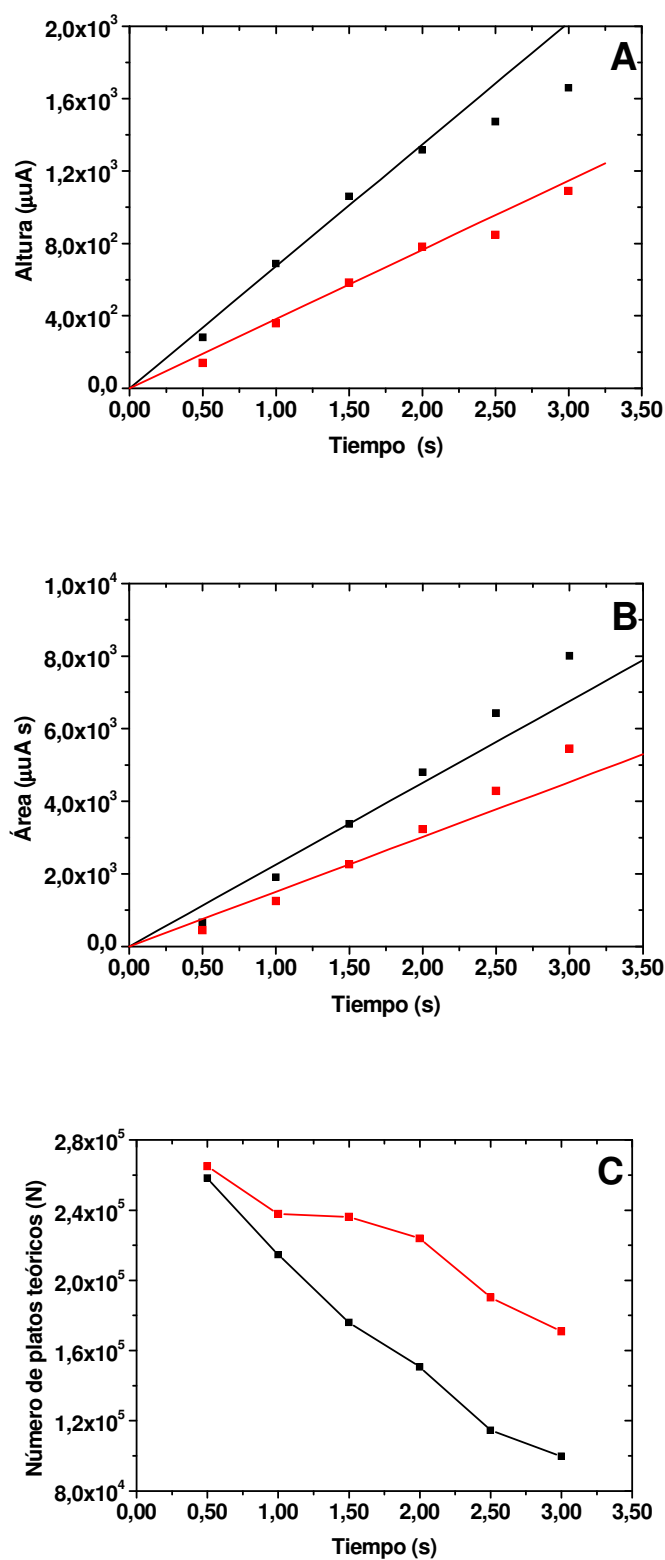


Figura 20.- Introducción de muestra hidrodinámica. Evolución de altura (A) y área (B) de pico y número de platos teóricos (C) con el tiempo de introducción de muestra. Amitrol (■) e hidroxiatrazina (■) en concentración 0.5 mg L<sup>-1</sup>. Condiciones igual que en figura 19.

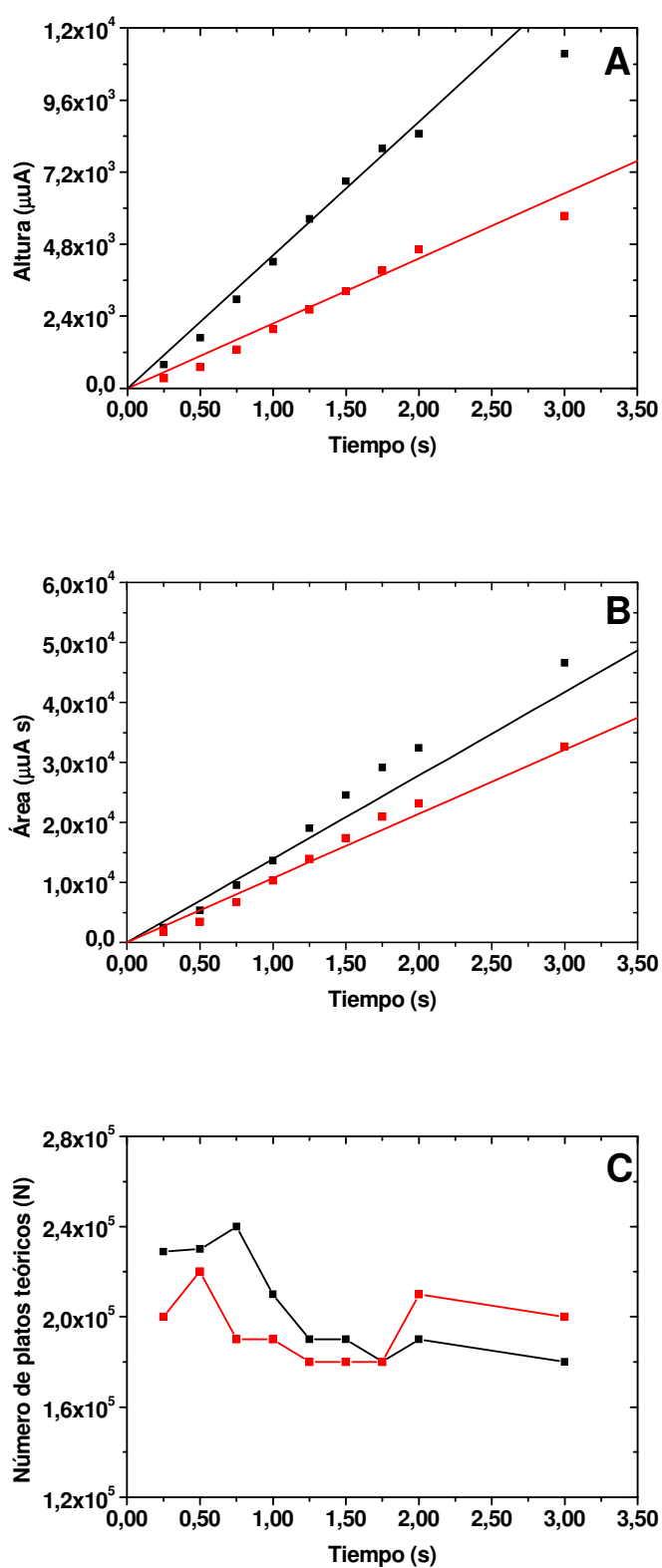


Figura 21.- Introducción de muestra hidrodinámica. Evolución de altura (A) y área (B) de pico y número de platos teóricos (C) con el tiempo de introducción de muestra. Amitrol (■) e hidroxiatrazina (■) en concentración  $3,0 \text{ mg L}^{-1}$ . Condiciones igual que en figura 19.

Como se observa en las figuras anteriores, la altura de pico de ambos analitos, varía linealmente para tiempos de introducción de muestra menores a 2.00 s.

En el estudio realizado para una concentración de herbicidas de 3.0 mg L<sup>-1</sup>, se observa un retraso en los tiempos de migración para tiempos de introducción de muestra superiores a 2.00 s, a la vez que un ligero ensanchamiento de los picos debido probablemente a una sobrecarga en la columna capilar, lo que produce una pérdida de eficacia en la separación.

En vista de los resultados obtenidos puede concluirse que el tiempo de introducción de muestra óptimo es de 1.00 s. Resultando un volumen de muestra introducido de 50 nL, calculado a partir de la ***ecuación de Poiseulle*** (expresión 18, pág 58).

Una vez seleccionado como tiempo de introducción de muestra óptimo, 1.00 s, se procede a evaluar la desviación estándar relativa (DER)<sup>83</sup>, también denominada coeficiente de variación porcentual (CV), del proceso de introducción de muestra. El estudio se lleva a cabo utilizando disoluciones de ambos herbicidas en concentración 3.0 mg L<sup>-1</sup>. Los valores de DER obtenidos en este estudio, quedan reflejados en la tabla 8. Estos valores, no superan en ningún caso el 3.5 % para el amitrol y el 3.7 % en el caso de la hidoxiatrazina. Cabe mencionar que los valores obtenidos de reproducibilidad coinciden en orden de magnitud con los reflejados en la bibliografía en los estudios realizados por ***Rose y Jorgenson***<sup>84</sup>.

Tabla 8.- Reproducibilidad en la introducción de muestra en modo hidrodinámico

Muestra Nº	Compuesto (3.00 mg L <sup>-1</sup> )	Tiempo de migración (min)	Altura de pico (µA)	Área de pico (µA s)	Número de platos teóricos
1	amitrol	9.2	3.5	11.6	2.0 x 10 <sup>5</sup>
	hidroxiatrazina	13.0	2.0	9.6	1.8 x 10 <sup>5</sup>
2	amitrol	9.3	3.6	11.2	2.0 x 10 <sup>5</sup>
	hidroxiatrazina	13.2	2.1	10.1	1.9 x 10 <sup>5</sup>
3	amitrol	9.3	3.6	11.9	2.1 x 10 <sup>5</sup>
	hidroxiatrazina	13.3	2.2	10.8	1.8 x 10 <sup>5</sup>
4	amitrol	9.4	3.5	11.5	2.1 x 10 <sup>5</sup>
	hidroxiatrazina	13.6	2.1	10.6	1.8 x 10 <sup>5</sup>
5	amitrol	9.4	3.8	11.9	2.1 x 10 <sup>5</sup>
	hidroxiatrazina	13.6	2.1	10.4	1.7 x 10 <sup>5</sup>
6	amitrol	9.4	3.7	11.7	2.1 x 10 <sup>5</sup>
	hidroxiatrazina	13.6	2.1	10.5	1.8 x 10 <sup>5</sup>
7	amitrol	9.4	3.8	11.8	2.1 x 10 <sup>5</sup>
	hidroxiatrazina	13.6	2.2	10.7	1.8 x 10 <sup>5</sup>
8	amitrol	9.4	3.8	12.1	2.1 x 10 <sup>5</sup>
	hidroxiatrazina	13.7	2.1	10.5	1.8 x 10 <sup>5</sup>
DER (%)	amitrol	0.8	3.5	2.3	2.2
	hidroxiatrazina	1.9	3.0	3.7	3.0

## **B. Introducción electrocinética**

La introducción de muestra electrocinética, se produce al aplicar un alto voltaje entre los extremos del capilar durante un periodo de tiempo determinado.

El estudio se lleva a cabo en dos pasos claramente diferenciados. Un primer paso en el que se fija el tiempo de introducción de muestra y se varía el voltaje, y un segundo paso en el que fijado el voltaje, se varía el tiempo de introducción de muestra. Para ello se emplean dos concentraciones diferentes de ambos compuestos, 1.0 y 3.0 mg L<sup>-1</sup>.

En la primera parte del estudio se fija como tiempo de introducción de muestra 2.00 s y se varía el voltaje entre 5.0 y 30.0 kV.

En las figuras 22 y 23 se presenta la evolución de la altura y el área de pico con el voltaje de introducción de muestra a las dos concentraciones estudiadas.

Para una concentración de los compuestos de 3.0 mg L<sup>-1</sup>, se observa una clara pérdida de linealidad al aplicar voltajes superiores a 20.0 kV, posiblemente debido a la sobrecarga de la columna provocada por un exceso de sustancia introducida o bien por la formación de burbujas de aire formadas a elevados voltajes<sup>85</sup>.

En la segunda parte del estudio se fija el voltaje aplicado en 20.0 kV, variando los tiempos de introducción de muestra entre uno y nueve segundos, obteniéndose los electroferogramas que se recogen en la figura 24.

En la figura 25 se muestra la evolución de la altura y el área de pico con el tiempo de introducción de muestra. Como puede observarse, el área y la altura de los picos aumentan linealmente hasta alcanzar un tiempo de introducción de muestra de 3.00 s, en ambos casos.

Se elige por tanto 3.00 s como tiempo óptimo de introducción de muestra aplicando un voltaje de 20.0 kV.

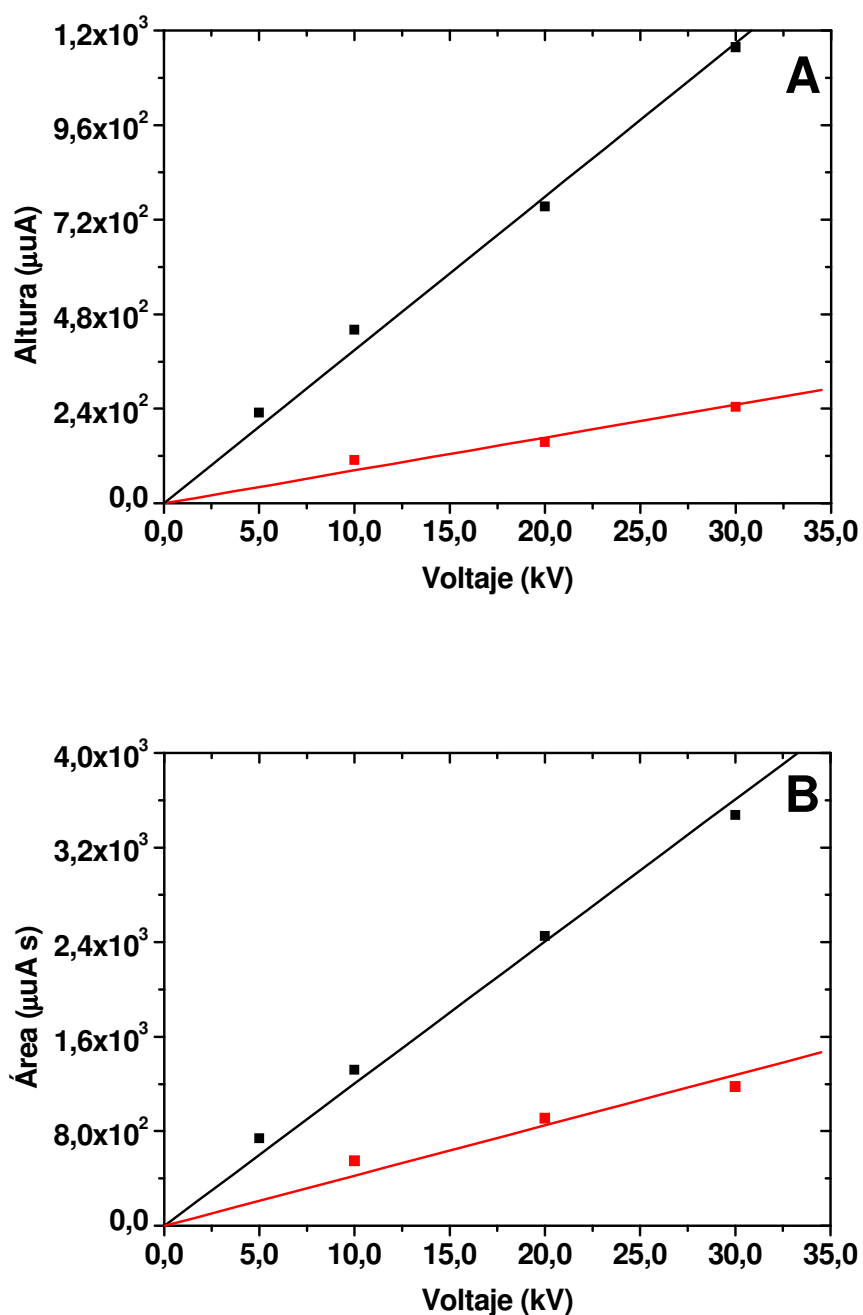


Figura 22.- Introducción de muestra electrocinética. Evolución de altura (A) y área de pico (B) con el voltaje de introducción de muestra. Amitrol (■) e hidroxiatrazina (■) en concentración  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ . Tiempo de introducción de muestra: 2,00 s; tampón de separación: fosfato  $0,020 \text{ mol L}^{-1}$  de pH 3,2; voltaje de separación: 25,0 kV; longitud total y efectiva de la columna capilar: 100 y 65 cm, respectivamente; longitud de onda de detección: 200 nm.

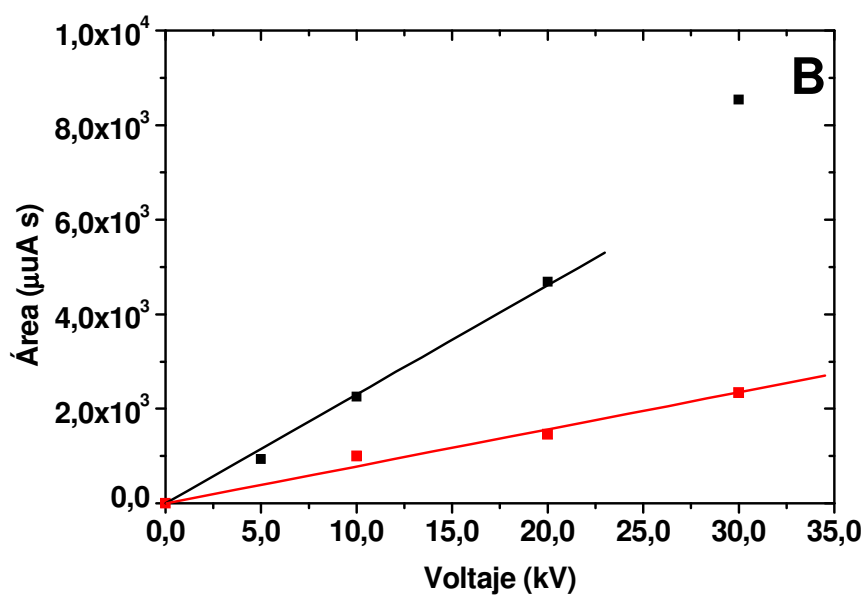
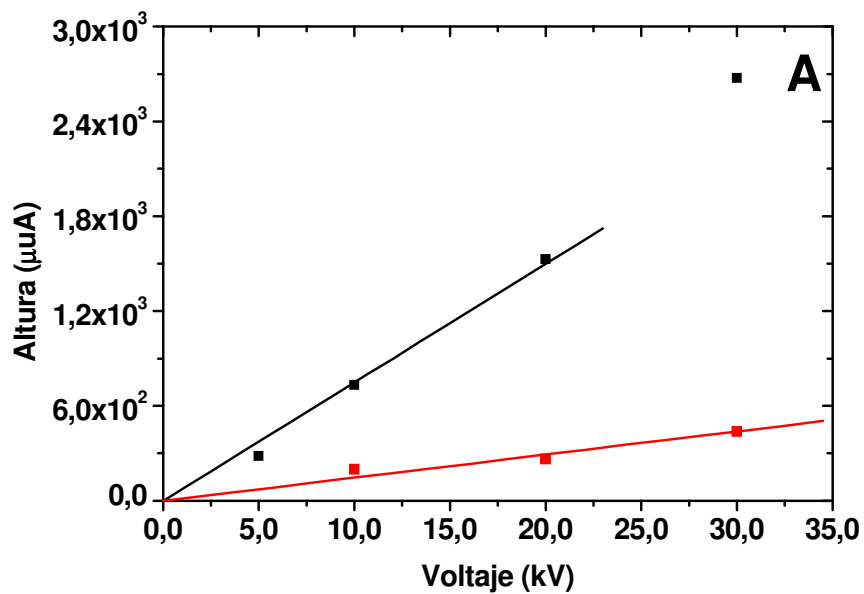


Figura 23.- Introducción de muestra electrocinética. Evolución de altura (A) y área de pico (B) con el voltaje de introducción de muestra. Amitrol (■) e hidroxiatrazina (■) en concentración  $3,0 \text{ mg L}^{-1}$ . Resto de condiciones igual que en figura 22.



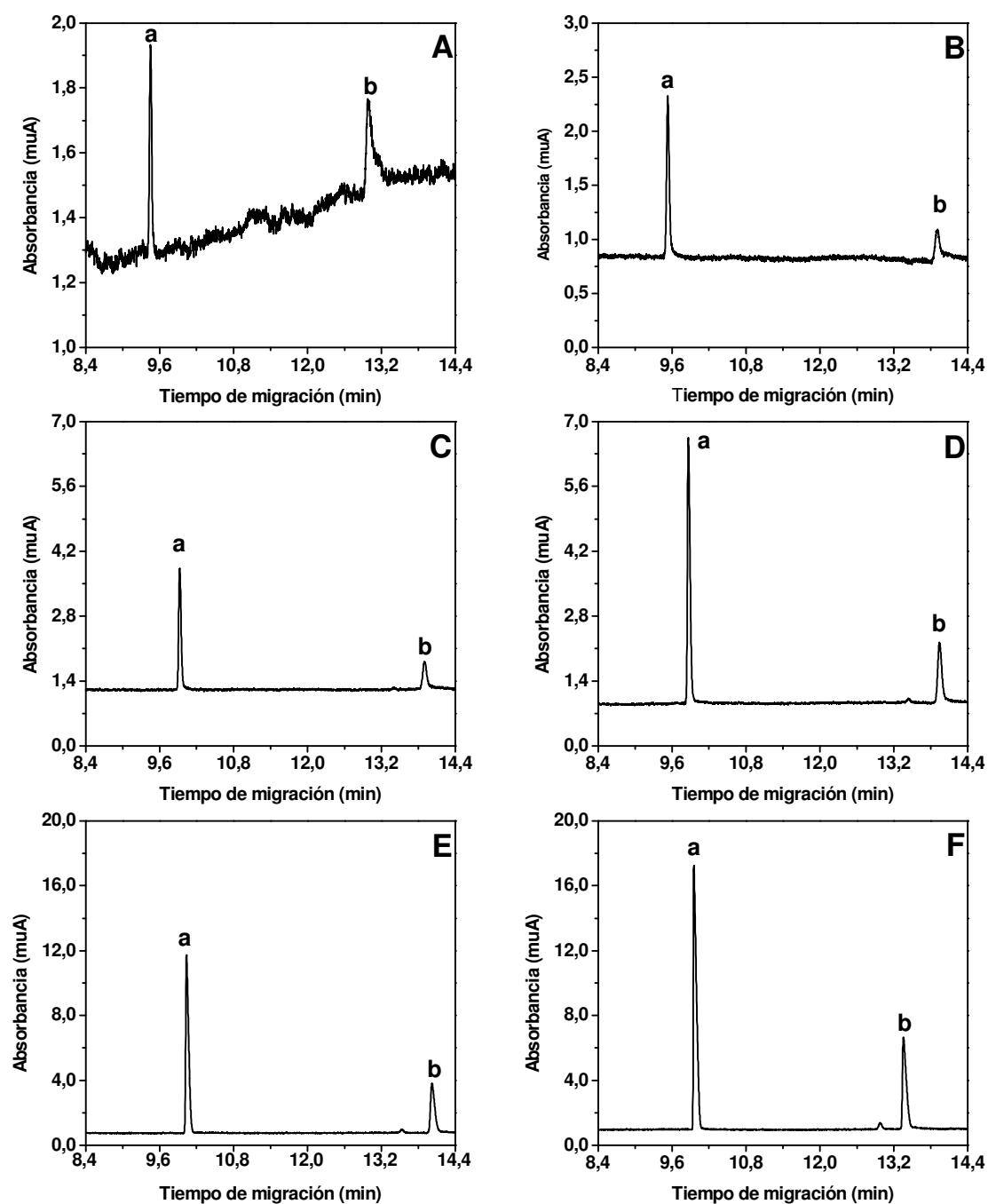


Figura 24.- Introducción de muestra electrocinética a diferentes tiempos: 1.00 (A), 2.00 (B), 3.00 (C), 5.00 (D), 7.00 (E) y 9.00 s (F) aplicando un voltaje de 20.0 kV. Amitrol (a) e hidroxiatrazina (b). Resto de condiciones igual que en figura 22.

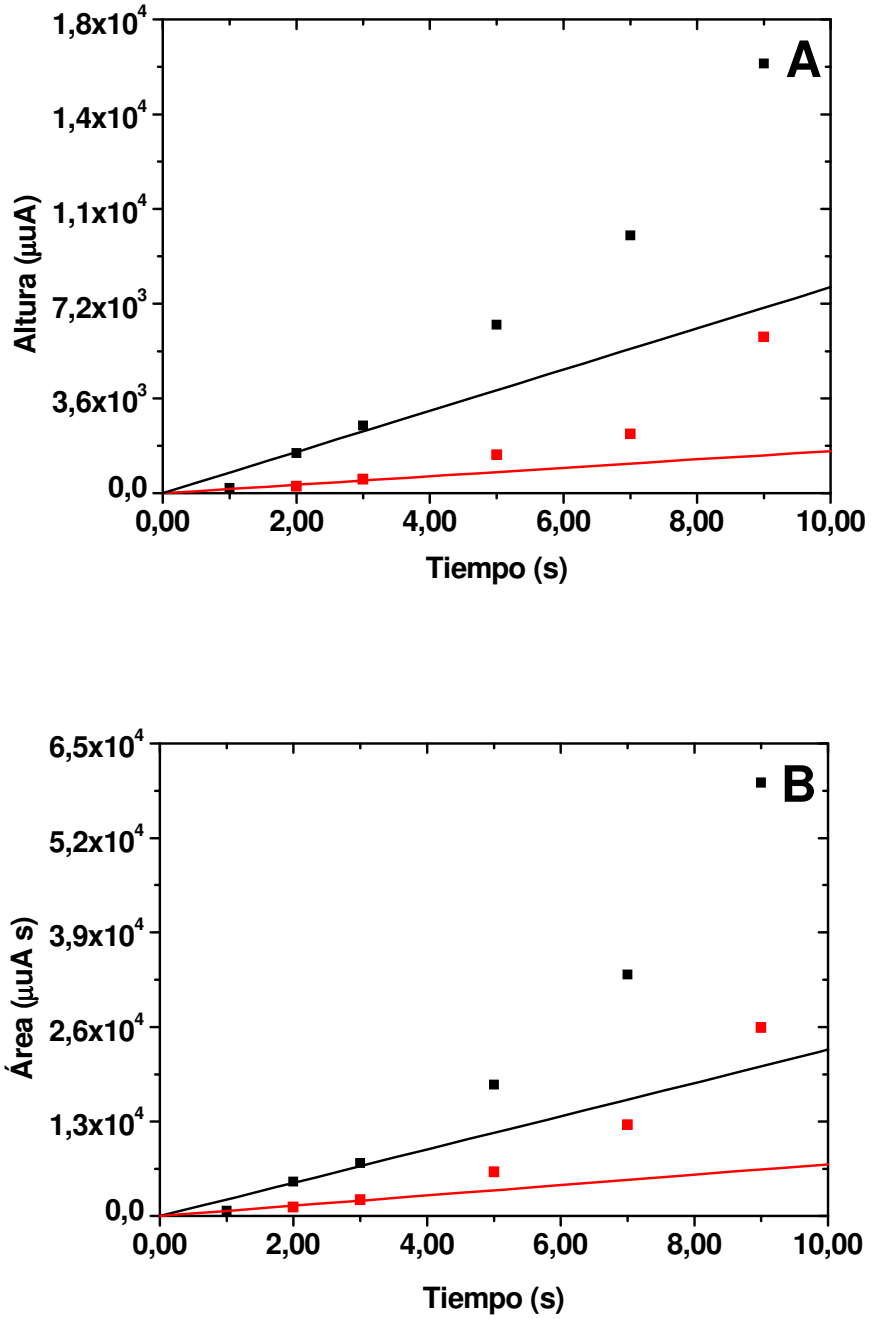


Figura 25.- Introducción de muestra electrocinética. Evolución de altura (A) y área de pico (B) con el tiempo de introducción de muestra, aplicando un voltaje de 20.0 kV. Amitrol (■) e hidroxiatrazina (■). Resto de condiciones igual que en figura 22.

A continuación, se realiza un estudio de reproducibilidad para la introducción de muestra electrocinética aplicando 20.0 kV durante 3.00 s. Para ello se emplean disoluciones de ambos compuestos en concentración 3.0 mg L<sup>-1</sup>. La tabla 9 recoge los resultados obtenidos.

Tabla 9.- Reproducibilidad en la introducción de muestra en modo electrocinético

Muestra N <sup>a</sup>	Compuesto (3.00 mg L <sup>-1</sup> )	Tiempo de migración (min)	Altura de pico ( $\mu$ A)	Área de pico ( $\mu$ A s)	Número de platos teóricos
1	amitrol	10.0	3,9	11.2	2.1 x 10 <sup>5</sup>
	hidroxiatrazina	14.1	1.1	5.9	1.4 x 10 <sup>5</sup>
2	amitrol	9.9	3.3	10.3	2.2 x 10 <sup>5</sup>
	hidroxiatrazina	14.0	1.0	4.9	1.7 x 10 <sup>5</sup>
3	amitrol	9.1	3.1	9.6	2.1 x 10 <sup>5</sup>
	hidroxiatrazina	13.8	0.9	4.1	2.0 x 10 <sup>5</sup>
4	amitrol	9.7	3.9	11.2	2.3 x 10 <sup>5</sup>
	hidroxiatrazina	13.8	1.1	5.3	2.0 x 10 <sup>5</sup>
5	amitrol	9.7	2.7	7.8	2.2 x 10 <sup>5</sup>
	hidroxiatrazina	13.8	0.7	3.2	2.0 x 10 <sup>5</sup>
6	amitrol	9.6	3.3	9.8	2.2 x 10 <sup>5</sup>
	hidroxiatrazina	13.8	1.0	4.7	2.0 x 10 <sup>5</sup>
7	amitrol	9.2	2.6	7.3	2.2 x 10 <sup>5</sup>
	hidroxiatrazina	13.7	0.7	3.1	2.1 x 10 <sup>5</sup>
8	amitrol	9.7	3.3	9.7	2.3 x 10 <sup>5</sup>
	hidroxiatrazina	13.6	1.0	4.4	2.2 x 10 <sup>5</sup>
9	amitrol	9.8	2.8	8.3	2.5 x 10 <sup>5</sup>
	hidroxiatrazina	13.8	0.8	3.7	2.0 x 10 <sup>5</sup>
10	amitrol	9.7	3.3	9.4	2.5 x 10 <sup>5</sup>
	hidroxiatrazina	13.8	1.0	4.7	2.1 x 10 <sup>5</sup>
DER (%)	amitrol	1.5	14.0	15.1	5.6
	hidroxiatrazina	1.0	17.6	19.8	11.4

Los valores de reproducibilidad obtenidos son peores que los reflejados en la bibliografía por ***Rose y Jorgenson***<sup>84</sup>, debido posiblemente a la falta de establecimiento del voltaje de introducción de muestra en el equipo utilizado, para tiempos cortos de introducción de muestra.

De la comparación de los resultados obtenidos en los estudios realizados con los dos modos de introducción de muestra, se deduce que la mayor precisión de la señal analítica se obtiene cuando se usa la introducción de muestra en modo hidrodinámico.

En consecuencia, se elige el modo de introducción de muestra hidrodinámico durante 1.00 s para posteriores estudios.

#### 4.1.5 MODIFICADORES DE FLUJO ELECTROSMÓTICO

Otra de las posibles variables a estudiar en electroforesis capilar es la adición de compuestos orgánicos al tampón de separación. Estos compuestos pueden variar las propiedades físico-químicas del tampón, afectando con ello a la movilidad aparente de los analitos a separar y por tanto a la separación en general.

Habitualmente es difícil predecir el efecto que la adición de estos disolventes orgánicos produce en la separación<sup>86</sup>.

*Generalmente, la adición de compuestos orgánicos disminuye la movilidad electrosmótica, debido a varias razones, como son<sup>87</sup>:*

- *Cambios en la viscosidad y en la constante dieléctrica del medio.*
- *Disminución del potencial zeta generado en la doble capa eléctrica, como consecuencia de:*
  - ✓ *Alteración del pH del medio por la variación en los valores del  $pK_a$  de los ácidos débiles utilizados en la preparación del medio electrolítico, en presencia de disolventes orgánicos.*
  - ✓ *Incremento del valor del  $pK_a$  de los grupos silanoles de la pared del capilar.*
  - ✓ *Modificaciones en la constante dieléctrica del medio.*

*Por otra parte, las movilidades electroforéticas de los analitos también pueden verse modificadas con la adición de los disolventes orgánicos al medio, debido a:*

- *Modificaciones en la viscosidad del medio.*
- *Modificaciones del tamaño y carga de los analitos.*
- *Modificaciones en la solubilidad de los analitos en el medio.*

En este estudio se evalúa la influencia de la adición de disolventes orgánicos miscibles al tampón de separación, eligiendo para ello metanol y acetonitrilo.

Se adicionan cantidades crecientes, hasta un máximo del 50 % (v:v), de estos disolventes orgánicos al tampón fosfato 0.020 mol L<sup>-1</sup> de pH 3.2, usado como electrolito de separación. Los análisis realizados bajo las condiciones óptimas anteriormente establecidas, se llevan a cabo con muestras de analitos en concentración de 3.0 mg L<sup>-1</sup> en agua.

En la figura 26 se muestran los electroferogramas obtenidos con la adición de metanol al medio.

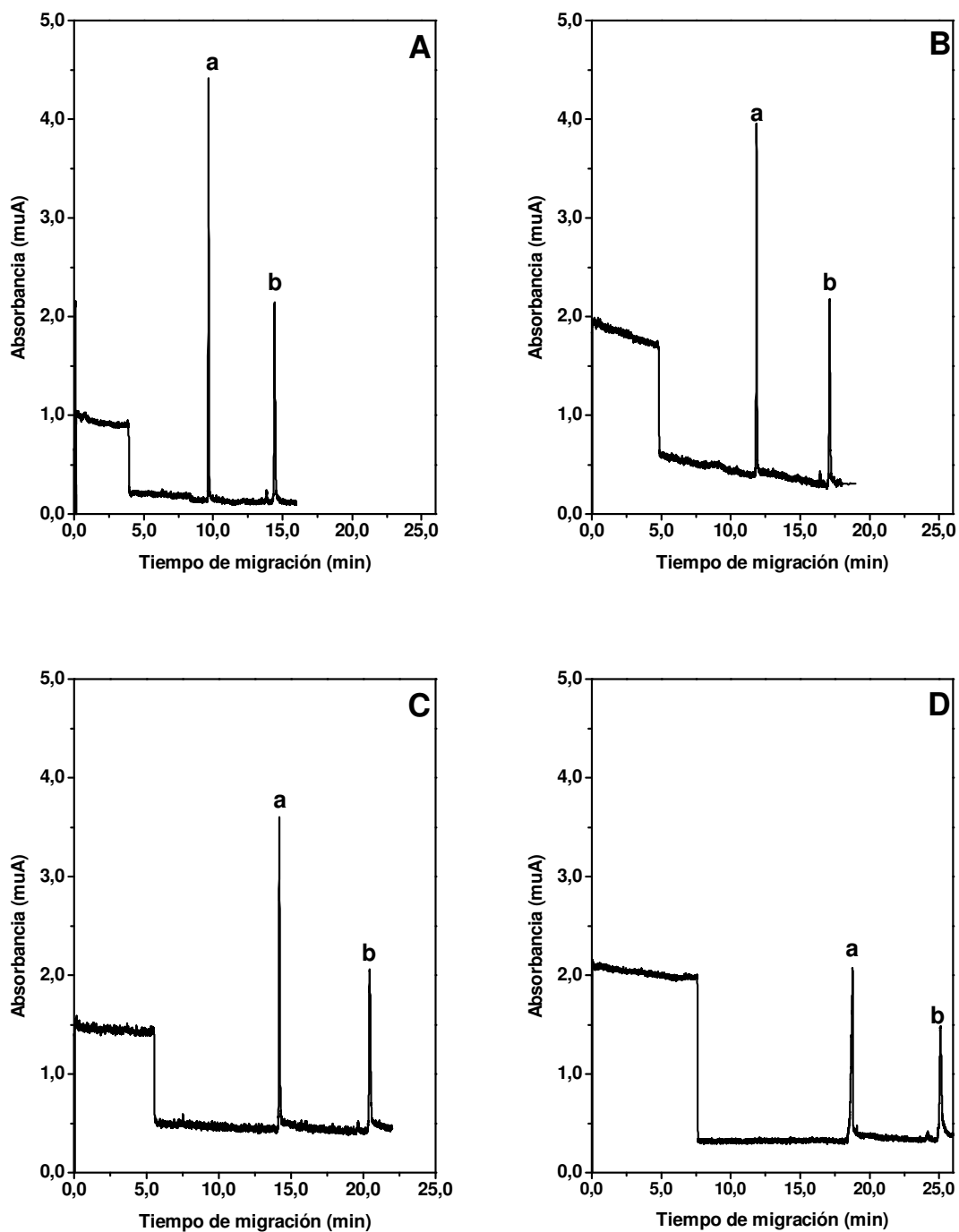


Figura 26.- Electroferogramas obtenidos con distintos porcentajes de metanol adicionados al tampón de separación: 0 (A), 10 (B), 20 (C) y 50% (D). Amitrol (a) e hidroxiatrazina (b) en concentración  $3.0 \text{ mg L}^{-1}$ . Tampón de separación: fosfato  $0.020 \text{ mol L}^{-1}$  de pH 3.2; voltaje de separación:  $25.0 \text{ kV}$ ; introducción de muestra hidrodinámica durante  $1.00 \text{ s}$ ; longitud de onda de detección UV:  $200 \text{ nm}$ .

Se observa que la adición de metanol, aumenta los tiempos de migración y disminuye la señal analítica de ambos compuestos. También, se produce un ensanchamiento de los picos con la adición del disolvente orgánico al tampón de separación.

El aumento de los tiempos de migración, puede ser debido al aumento de la viscosidad del medio como consecuencia de la adición de metanol. Además esta adición del disolvente al medio, puede modificar los valores de los  $pK_a$  de los compuestos, por lo que su relación carga/tamaño puede haberse visto modificada.

La pérdida de señal podría deberse a una modificación de los coeficientes de absorptividad molar de los compuestos en presencia de metanol. Por otra parte, el aumento de la anchura de pico es una consecuencia lógica de la disminución de la movilidad de los compuestos.

En la figura 27, se muestran los electroferogramas obtenidos por la adición de acetonitrilo al medio. Se observa que el tiempo de migración del amitrol permanece prácticamente constante y el de la hidroxiatrazina disminuye con la adición de un 50 % del disolvente, disminuyendo por tanto la resolución de la separación.

La disminución del tiempo de migración de la hidroxiatrazina con la adición de un 50% de acetonitrilo al medio, nos indica un aumento de su movilidad electroforética. Este aumento puede deberse a una disminución de su valor de  $pK_a$  en presencia del disolvente, lo que origina que su relación carga/tamaño aumente.

De los resultados expuestos se deduce que la adición, de metanol y acetonitrilo hasta un 50% (v:v) al tampón de separación, no ofrece mejora alguna en la separación, por lo que se decide no adicionar disolventes al tampón en los estudios posteriores.

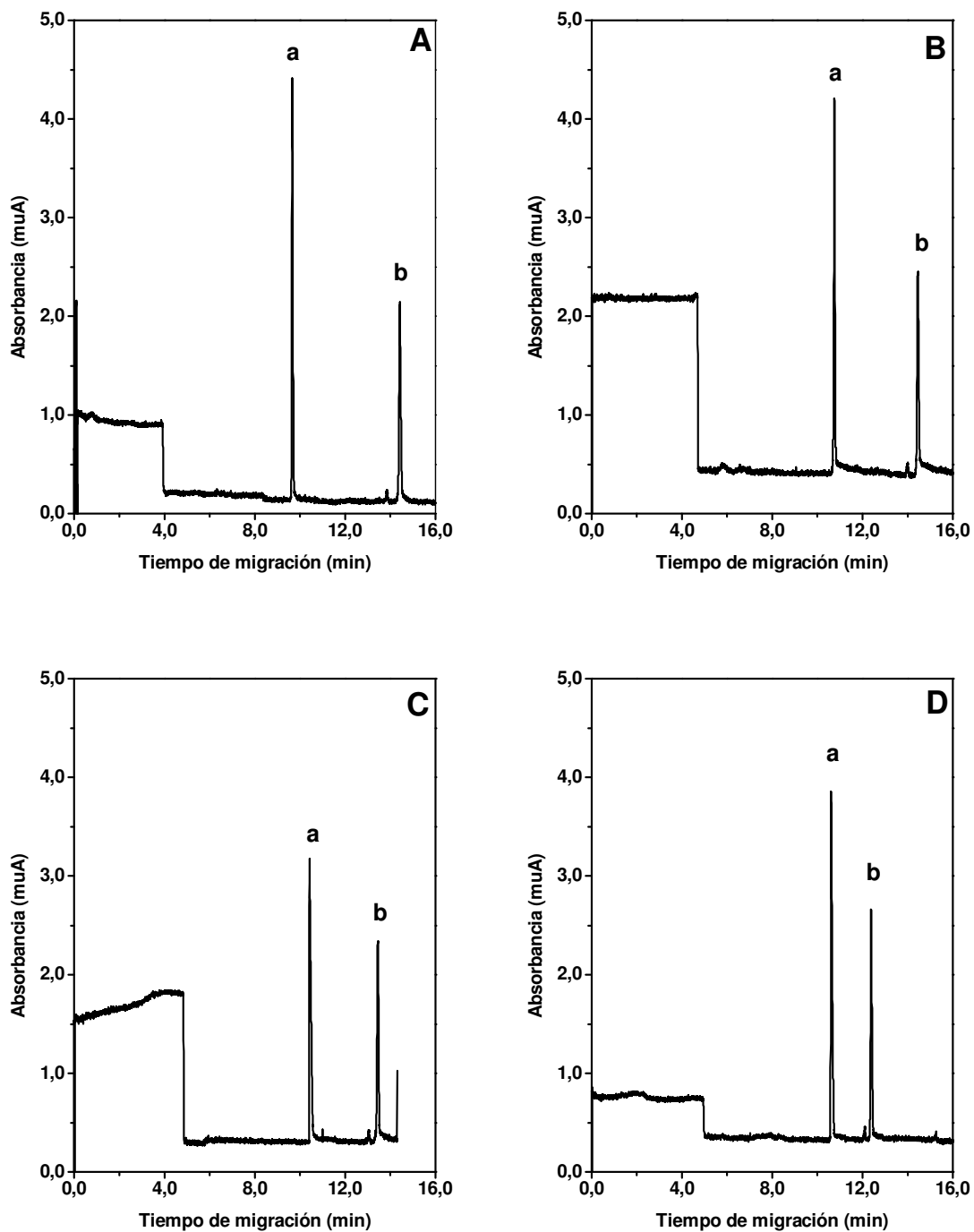


Figura 27.- Electroferogramas obtenidos con distintos porcentajes de acetonitrilo adicionados al tampón de separación: 0 (A), 20 (B), 35 (C) y 50% (D). Amitrol (a) e hidroxiatrazina (b) en concentración  $3.0 \text{ mg L}^{-1}$ . Resto de condiciones igual que en figura 26.



#### 4.1.6 INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE IONES DE LA MUESTRA

La concentración de iones de la muestra, afecta a la señal analítica de los compuestos debido al efecto denominado “*stacking*”.

Este efecto de “*stacking*” se produce como consecuencia de la dependencia directa de la velocidad electroforética con la fuerza de campo eléctrico (expresión 1, pág 50). Debido a la diferente conductividad entre la muestra y el tampón de separación, cuando se aplica el voltaje de separación entre los extremos del capilar, los iones que se encuentran en una región de menor conductividad (menor concentración iónica) experimentarán una mayor fuerza de campo, y por lo tanto se moverán con una velocidad mayor.

Si los analitos se disuelven en una disolución tampón de baja fuerza iónica o en agua destilada, una vez introducida la muestra, antes de aplicar el voltaje, se encontrarán distribuidos homogéneamente en la zona introducida, cuya composición será fundamentalmente la del disolvente de la muestra, en nuestro caso hasta el momento, agua. Al aplicar el voltaje de separación, la fuerza del campo eléctrico a través de la muestra será mayor que la fuerza del campo eléctrico a través de toda la columna, ya que la resistividad del agua es mayor que la del electrolito, produciéndose un considerable aumento de la movilidad de los iones de la muestra, hasta que alcanza la zona de interfase con el electrolito de separación, debido a que la movilidad electroforética de los solutos aumenta directamente con la fuerza del campo eléctrico aplicado. Una vez que los iones pasan la zona límite de concentración entre el disolvente de la muestra y el tampón que llena el resto de la columna, experimentan inmediatamente un campo eléctrico menor, reduciéndose su velocidad. De este modo se forma una banda estrecha de analito en la zona del tampón de separación, que migra hacia el detector con una velocidad correspondiente a su movilidad neta.

Este efecto de “*stacking*”, propio de analitos cargados positiva o negativamente, se incrementa cuanto mayor es la diferencia de fuerza iónica (diferencia de conductividad) entre el tampón de separación y la disolución de la muestra.

Para la realización de este estudio se prepara la muestra de amitrol e hidroxiatrazina en concentración  $3.0 \text{ mg L}^{-1}$  en diferentes medios: agua, tampón fosfato de pH 3.2 en diferentes concentraciones ( $0.010$ ,  $0.020$  y  $0.030 \text{ mol L}^{-1}$ ) y cloruro sódico en diferentes concentraciones ( $0.001$ ,  $0.005$ ,  $0.010$ ,  $0.025$  y  $0.050 \text{ mol L}^{-1}$ ). Algunos de los electroferogramas obtenidos se muestran en las figuras 28 y 29.

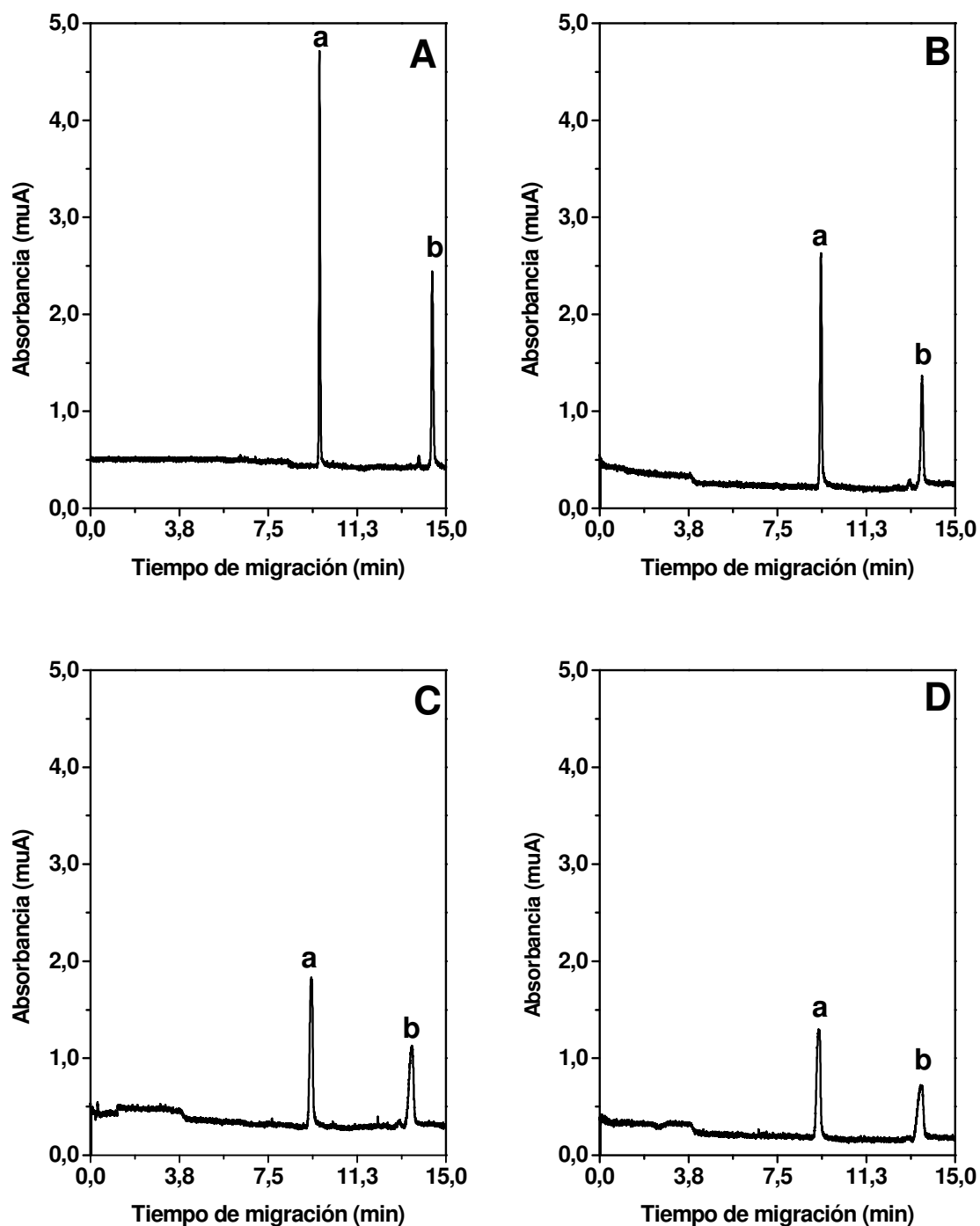


Figura 28.- Electroferogramas de la muestra en agua (A) y tampón fosfato 0.010 (B), 0.020 (C) y 0.030 mol L<sup>-1</sup> (D). Amitrol (a) e hidroxiatrazina (b) en concentración 3.0 mg L<sup>-1</sup>. Tampón de separación: fosfato 0.020 mol L<sup>-1</sup> de pH 3.2; voltaje de separación: 25.0 kV; introducción de muestra hidrodinámica durante 1.00 s, longitud de onda de detección: 200 nm.

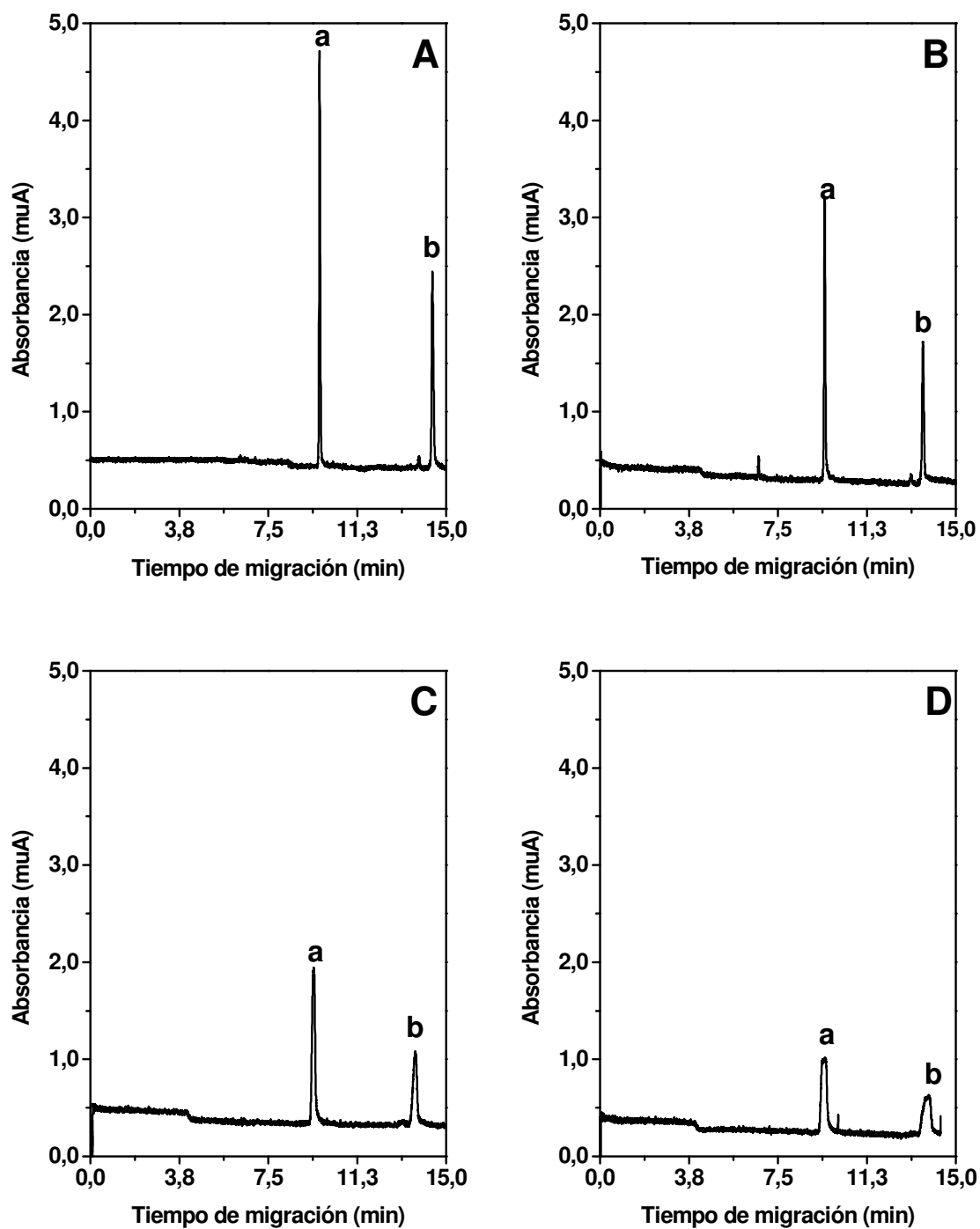


Figura 29.-Electroferogramas de la muestra en agua (A) y NaCl 0.005 (B), 0.025 (C) y 0.050 mol L<sup>-1</sup> (E). Amitrol (a) e hidroxiatrazina (b) en concentración 3.0 mg L<sup>-1</sup>. Resto de condiciones en figura 28.

Como puede observarse en estas figuras, con el aumento de la concentración de iones en la muestra, la señal analítica de ambos herbicidas se ensancha y baja en altura. Esto es debido a la disminución de la diferencia de conductividades entre la muestra y el tampón de separación y por lo tanto se evita que se produzca "stacking".

Después de los resultados obtenidos en este estudio, todas las muestras preparadas para la realización de estudios posteriores, son diluidas con agua.

#### 4.1.7 LONGITUD TOTAL Y EFECTIVA DE LA COLUMNA CAPILAR

A la vista de la elevada diferencia obtenida en los tiempos de migración de los compuestos, bajo las condiciones de separación establecidas hasta el momento, y con el fin de acortar el tiempo de análisis, se realiza un estudio del efecto de la disminución de las longitudes efectiva y total, de la columna capilar.

Para ello se mantiene fija la distancia del detector al vial destino (35 cm), se varía la longitud total de la columna capilar entre 100 y 80 cm, con lo cual, la longitud efectiva varía entre 65 y 45 cm.

En la figura 30, se muestra la evolución de los tiempos de migración con la longitud efectiva de la columna capilar.

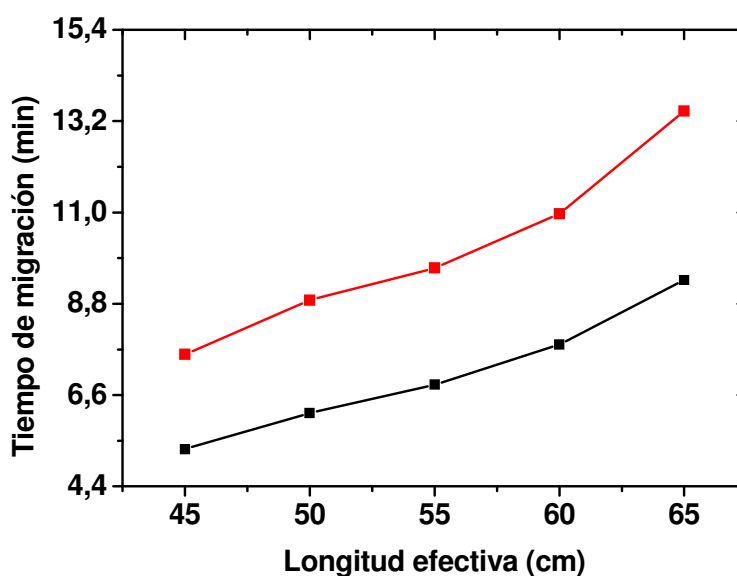
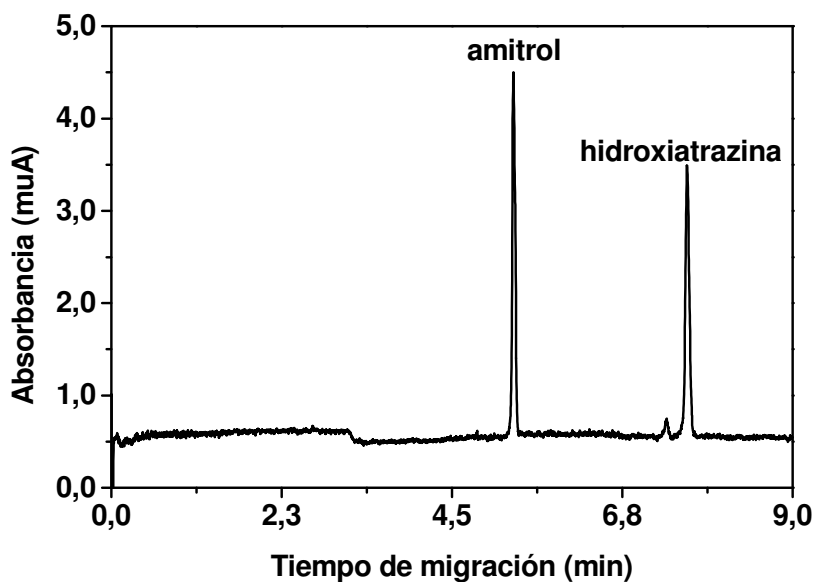


Figura 30.- Evolución de los tiempos de migración con la longitud efectiva de la columna capilar para amitrol (■) e hidroxiatrazina (■). Condiciones óptimas de separación y detección.

Como era de esperar, los tiempos de análisis disminuyen cuando las longitudes total y efectiva del capilar se reducen. Al mismo tiempo se observa una disminución de la eficacia de la separación, dado que capilares más cortos muestran menores resistencias y por lo tanto generan mayores corrientes.

Se elige 45 cm de longitud efectiva de la columna, con el fin de acortar los tiempos de análisis. Como se muestra en la figura 31, se mantiene una buena resolución en la separación.



**Figura 31.- Electroferograma obtenido bajo las condiciones óptimas de separación y detección establecidas. Concentración de los herbicidas 3.0 mg L<sup>-1</sup>.**

Con los resultados obtenidos en este estudio, se da por finalizada la puesta a punto del método de separación de amitrol e hidroxiatrazina por CZE-UV.

Las condiciones óptimas de separación y detección se resumen en la tabla 10.

Tabla 10.- Condiciones óptimas de separación y detección de amitrol e hidroxiatrazina por CZE-UV

<b>Medio electroforético</b>	Tampón fosfato 0.020 mol L <sup>-1</sup> de pH 3.2
<b>Voltaje de separación</b>	25.0 kV
<b>Introducción de muestra</b>	Hidrodinámica durante 1.00 s
<b>Longitud efectiva y total de la columna capilar</b>	45 y 80 cm
<b>Disolvente de muestra</b>	agua
<b>Longitud de onda de detección</b>	200 nm

Una vez establecidas las condiciones óptimas de separación, se evalúan la movilidad electrosmótica y las movilidades electroforéticas de ambos compuestos. Para ello se realizan diez análisis de una muestra que contiene amitrol e hidroxiatrazina en concentración  $3.0 \text{ mg L}^{-1}$  en un 10% de metanol. El metanol se utiliza como marcador del flujo electrosmótico. Al cabo de 3 horas de análisis no se aprecia ninguna señal correspondiente al metanol, por lo que consideramos que la movilidad electrosmótica es despreciable frente a las movilidades electroforéticas de ambos compuestos, bajo las condiciones experimentales del estudio.

En la tabla 11 quedan reflejadas las movilidades electroforéticas de ambos compuestos, evaluadas a partir de la expresión 7 (pág 54).

Tabla 11.- Movilidades electroforéticas de amitrol e hidroxiatrazina bajo condiciones óptimas de separación

Compuesto	$\mu_{ep} (\text{cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1})$
amitrol	$4.5 \times 10^{-4}$
hidroxiatrazina	$3.2 \times 10^{-4}$

#### 4.1.8 ESTUDIO DE LOS PARÁMETROS ANALÍTICOS

Una vez establecidas las condiciones más favorables para la separación y detección de los compuestos, se procede a estudiar los parámetros analíticos de su determinación.

##### A. Influencia de la concentración de amitrol e hidroxiatrazina

Para la realización de este estudio se preparan diferentes disoluciones acuosas que contienen amitrol e hidroxiatrazina en concentración comprendida entre 0 y 5.0 mg L<sup>-1</sup>, registrando los electroferogramas bajo las condiciones óptimas anteriormente citadas en la tabla 10. Se realizan seis análisis para cada disolución, empleando posteriormente la media de los resultados obtenidos.

La figura 32 muestra la evolución de las alturas y áreas de pico de amitrol e hidroxiatrazina. La señal es proporcional a la concentración de los compuestos en todo el margen estudiado para la altura y el área de pico.

Los parámetros de calibración calculados incluyen la pendiente (S) (sensibilidad) y la ordenada en el origen, con sus respectivas desviaciones estándar y los coeficientes de regresión (r), y se recogen en la tabla 12 para el amitrol y en la tabla 13 para la hidroxiatrazina.

Tabla 12.- Parámetros de calibración del amitrol

	Pendiente (S)	Ordenada	r	n
Altura	1.27±0.03	-0.1±0.1	0.9990	6
Área	2.7±0.1	-0.3±0.2	0.998	6

Las unidades de la pendiente y la ordenada son [µA L mg<sup>-1</sup>] y [µA] para la altura y [µA s L mg<sup>-1</sup>] y [µA s] para el área respectivamente.

Tabla 13.- Parámetros de calibración de la hidroxiatrazina

	Pendiente (S)	Ordenada	r	n
Altura	0.96±0.02	0.1±0.1	0.998	6
Área	2.7±0.1	-0.3±0.3	0.997	6

Las unidades de la pendiente y la ordenada son [µA L mg<sup>-1</sup>] y [µA] para la altura y [µA s L mg<sup>-1</sup>] y [µA s] para el área respectivamente.



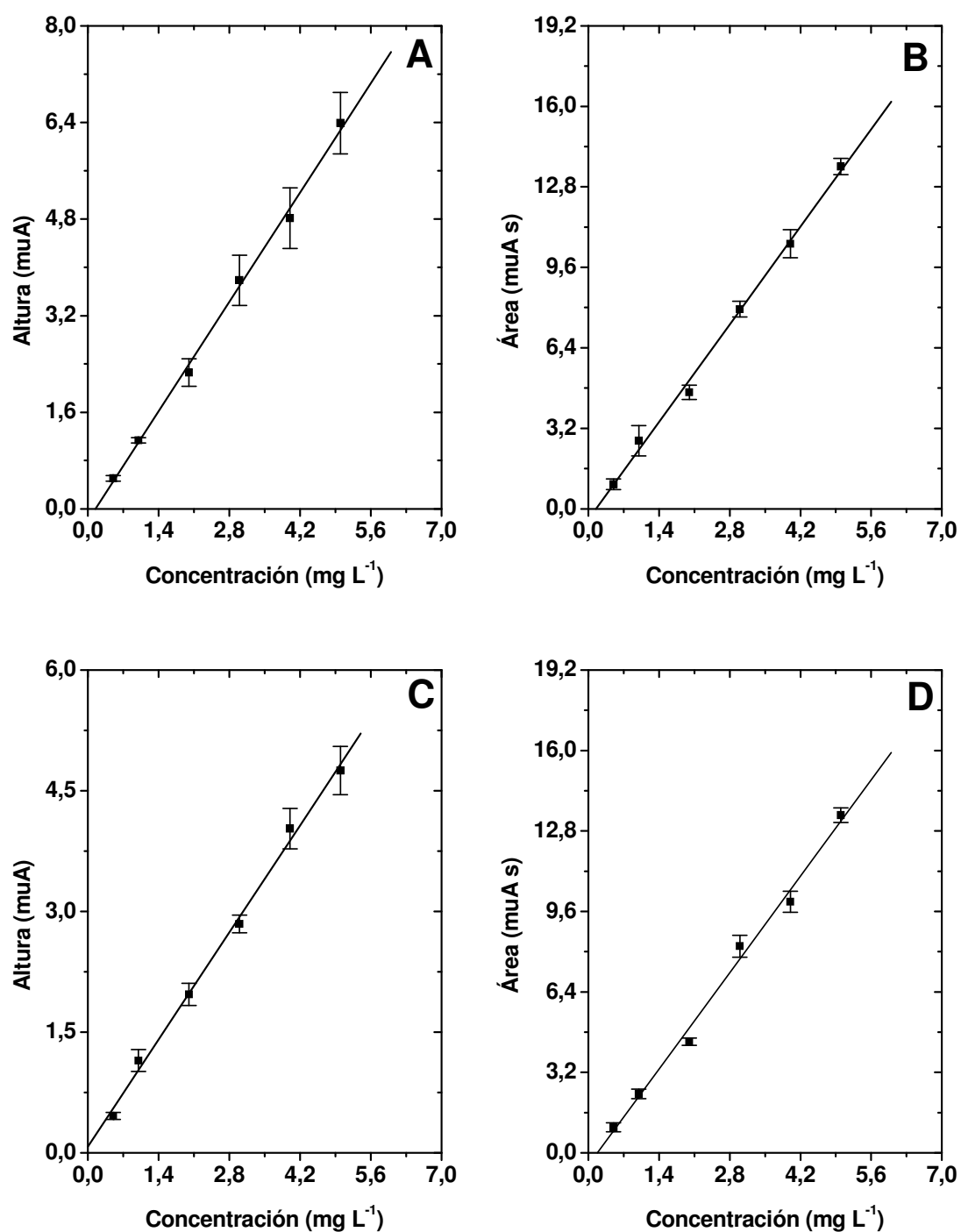


Figura 32. Influencia de la concentración en la altura y área de los picos de amitrol (A y B) y de la hidroxiatrazina (C y D). Se incluye la desviación estándar de cada punto (n=6).

## **B. Cálculo del límite de detección**

En términos generales, se define límite de detección de un analito como<sup>88</sup>:

*“la concentración de analito que proporciona una señal en el instrumento(s) significativamente diferente de la señal de fondo”.*

En el caso de la electroforesis capilar se define el límite de detección como<sup>83</sup>:

*“la concentración de analito que origina una relación señal/ruido, igual a un determinado valor, que generalmente es 2 o 3”*

Para la estimación de los límites de detección del método puesto a punto, se emplea la variación de la señal de base, también denominada ruido de fondo ( $N$ ), en la zona de los electroferogramas cercana a la posición de los picos de amitrol e hidroxiatrazina y se calculan utilizando la siguiente expresión:

$$C_{LOD} = \frac{3N}{S} \quad (25)$$

donde  $S$  es la sensibilidad del método analítico. Los resultados obtenidos para ambos compuestos se muestran en la tabla 14:

Tabla 14.- Ruido de fondo, sensibilidad y límites de detección de amitrol e hidroxiatrazina

<b>Compuesto</b>	<b><math>N</math> (<math>\mu\text{A}</math>)</b>	<b><math>S</math> (<math>\mu\text{A L mg}^{-1}</math>)</b>	<b><math>LOD</math> (<math>\text{mg L}^{-1}</math>)</b>	<b><math>LOD</math> (ng)</b>
<b>amitrol</b>	0.038	1.27±0.03	0.090	4.6 × 10 <sup>-3</sup>
<b>hidroxiatrazina</b>	0.038	0.96±0.02	0.12	6.1 × 10 <sup>-3</sup>

#### **4.1.9 ESTUDIO DE DEGRADACIÓN DE AMITROL Y ATRAZINA**

La metodología puesta a punto permite realizar un seguimiento de los procesos degradativos de amitrol y de atrazina en diferentes medios y condiciones. Como ya se ha indicado al inicio del capítulo, la atrazina es un herbicida triazínico ampliamente utilizado, sujeto a varios procesos de degradación en el medio, siendo la hidroxiatrazina su producto principal de degradación. El método puesto a punto, nos va a permitir conocer bajo que condiciones está favorecido este proceso de degradación, mediante el seguimiento de la señal analítica de la hidroxiatrazina con el tiempo. Además, la evolución de la señal analítica de amitrol, almacenado en diferentes medios y distintas condiciones, con el tiempo, permitirá conocer la estabilidad química y fotoquímica del herbicida.

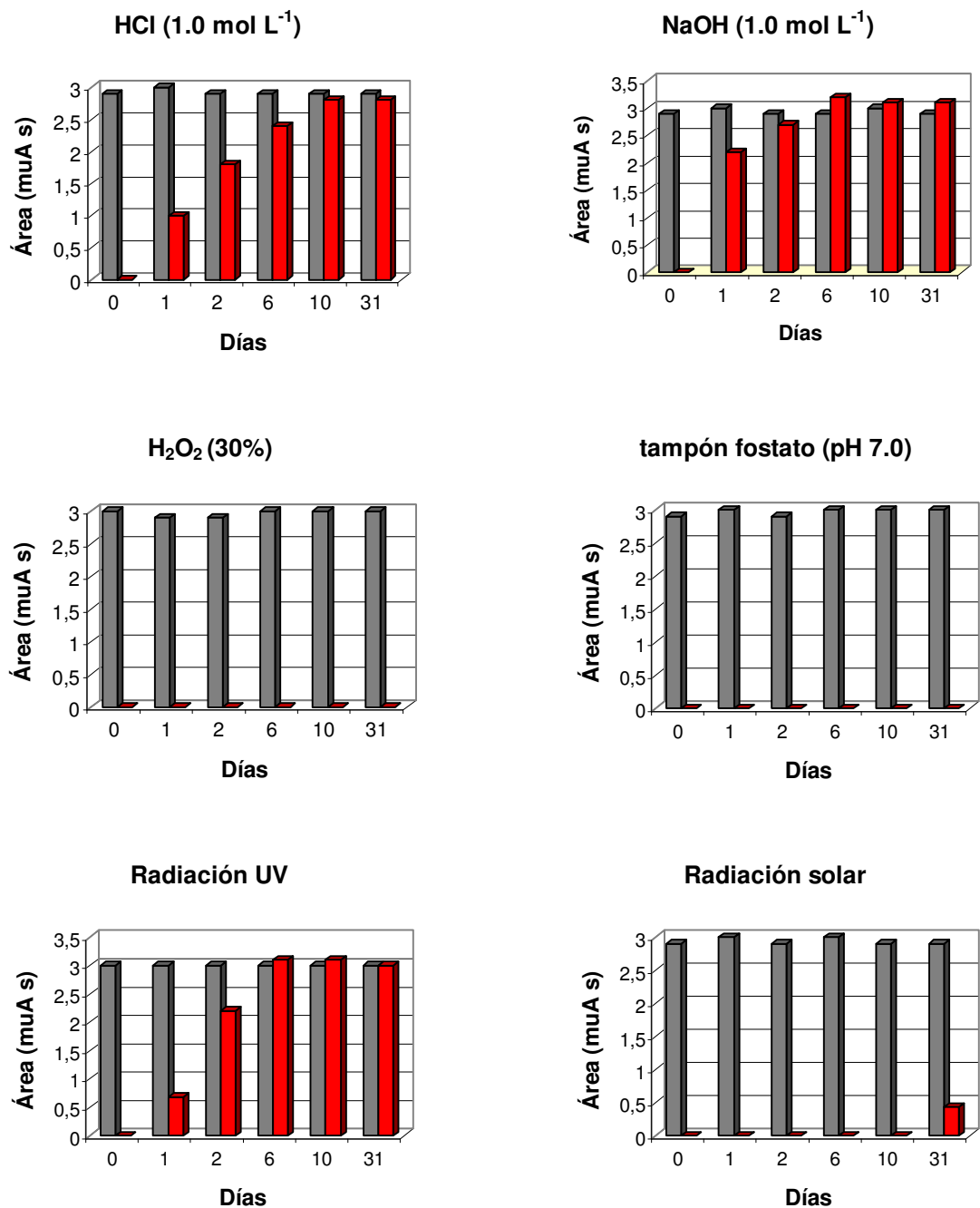
Para llevar a cabo este estudio se preparan distintas disoluciones de amitrol y atrazina en concentración  $5.0 \text{ mg L}^{-1}$  en diferentes medios y se las somete a diferentes condiciones, posteriormente para su análisis se diluyen con agua destilada a concentración  $1.0 \text{ mg L}^{-1}$ .

Para el estudio de la estabilidad química se prepararan disoluciones de amitrol y atrazina en diferentes medios: NaOH  $1.0 \text{ mol L}^{-1}$ , HCl  $1.0 \text{ mol L}^{-1}$ , tampón fosfato ajustado a pH 7.0, y  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30%). Todas las disoluciones se almacenan en botes topacio y bajo refrigeración. Se analizan, bajo condiciones óptimas de separación, recién preparadas (tiempo cero) y a diferentes tiempos.

En la figura 33 se muestran los resultados obtenidos para cada uno de los medios estudiados. Se ha representado el área de los picos frente al tiempo de almacenaje. Como puede observarse, el amitrol es estable en cada uno de los medios permaneciendo el área de pico prácticamente constante en los intervalos de tiempos estudiado. En el caso de las disoluciones preparadas en medio ácido y alcalino, la señal correspondiente a la hidroxiatrazina aparece a las 24 h y aumenta con el tiempo, debido a la degradación, vía deshalogenación, de la atrazina.

El estudio de la estabilidad fotoquímica de los herbicidas objeto de estudio, se realiza exponiendo disoluciones acuosas de los herbicidas en concentración  $5.0 \text{ mg L}^{-1}$  a radiación UV de longitud de onda de 290 nm (potencia de 15 W) y radiación solar natural. Posteriormente estas muestras se diluyen con agua destilada a concentración  $1.0 \text{ mg L}^{-1}$  y se analizan, a tiempo cero y diferentes tiempos de exposición. La figura 33 presenta la evolución de la señal analítica obtenida por CZE del amitrol e hidroxiatrazina durante el

estudio. La señal de amitrol permanece estable durante todo el tiempo y la señal correspondiente a la hidroxiatrazina se hace notable a las 24 h en el caso de las disoluciones expuestas a luz UV y a partir de los 10 días en el caso de las disoluciones expuestas a radiación solar.



**Figura 33.- Evolución del área de los picos de amitrol (■) e hidroxiatrazina (■) con el tiempo de almacenaje, en diferentes medios y condiciones.** Concentración de los compuestos 1.0 mg L<sup>-1</sup>. Condiciones óptimas de separación y detección.

#### **4.1.10 DETERMINACIÓN DE AMITROL EN MUESTRAS DE AGUA**

Después del desarrollo del método analítico, se estudia su aplicabilidad a la determinación de amitrol en muestras de aguas medioambientales.

Teniendo en cuenta que el nivel mínimo de residuos de plaguicidas que establece la Comunidad Europea para aguas potables<sup>89</sup> es de  $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$ , y los límites de detección alcanzados con la metodología analítica puesta a punto, es necesario realizar una preconcentración de la muestra con el fin de bajar los límites de detección.

En los trabajos publicados hasta el momento, queda patente la dificultad encontrada en la determinación de amitrol a nivel de trazas en el agua, debido principalmente a la falta de procedimientos eficaces que permitan su extracción y preconcentración en muestras acuosas. Su separación por extracción líquido-líquido resulta prácticamente imposible teniendo en cuenta su baja solubilidad en disolventes orgánicos (Hexano:  $1 \text{ mg L}^{-1}$ ; Cloruro de metileno:  $11 \text{ mg L}^{-1}$ ) y su alta solubilidad en agua ( $280 \text{ g L}^{-1}$ ). Por otro lado, la extracción en fase sólida (SPE) empleando cartuchos  $\text{C}_{18}$  no es posible dada la alta polaridad del herbicida<sup>48</sup>.

La bibliografía describe la extracción y preconcentración de amitrol en muestras de agua reales utilizando cartuchos de intercambio catiónico<sup>48,50</sup>, pero las recuperaciones obtenidas son muy pobres debido a que los cartuchos se saturan con los cationes inorgánicos presentes en el agua. Hasta el momento, la evaporación de muestra ha resultado ser el mejor método de preconcentración de amitrol en agua<sup>46-48,50</sup>.

Teniendo en cuenta estos resultados, en este estudio se decide llevar a cabo la preconcentración de amitrol por evaporación de las muestras de agua.

Se realiza el siguiente procedimiento: se evaporan muestras de 2.5 mL hasta sequedad en un baño de agua a  $50^{\circ}\text{C}$  en atmósfera de nitrógeno, posteriormente el residuo se reconstituye con 100  $\mu\text{L}$  de agua destilada. Los extractos obtenidos, se microfiltran y se analizan introduciéndolos directamente en el equipo de electroforesis capilar, empleando para ello microviales de 100  $\mu\text{L}$ .

Con este procedimiento se logra una preconcentración de 25 veces.

La evaporación de volúmenes mayores, no produce mejoras en la señal, ya que también se produce la preconcentración de diversos compuestos presentes en el agua, afectando a la determinación final.

Para comprobar la aplicabilidad del método se analizan muestras de agua de grifo y muestras de agua del río Alberche.

En primer lugar se analizan las muestras de agua sin dopar, con el fin de comprobar la presencia del herbicida en ellas y a continuación se analizan distintas muestras dopadas con diferentes niveles de concentración de amitrol.

La figura 34 muestra a modo de ejemplo los electroferogramas obtenidos para la muestra de agua de grifo y la muestra de agua de grifo previamente dopada con amitrol al nivel de  $0.040 \text{ mg L}^{-1}$ . Ambas se sometieron al proceso de preconcentración descrito. Como puede observarse, el electroferograma de la muestra de agua de grifo sin dopar no presenta el correspondiente pico del herbicida, indicando la no presencia de amitrol en la muestra analizada al nivel de concentración detectable con la metodología empleada.

Se elige el método de adición estándar para realizar la determinación de amitrol en el agua. Se utilizan muestras de agua dopada con amitrol en concentración  $0.040 \text{ mg L}^{-1}$ . Se toman alícuotas de  $2.5 \text{ mL}$  de la muestra dopada. Seguidamente, sobre tres de las alícuotas se realiza una adición de amitrol de concentración  $0.020$ ,  $0.040$  y  $0.060 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente, evaporando y analizando las muestras bajo condiciones óptimas de separación.

En la figura 34 se muestra la representación gráfica de la altura de pico frente a concentración adicionada de amitrol para una de las muestra de agua de grifo y para una de las muestras del agua de río. Los resultados obtenidos son similares a los obtenidos en el método con agua destilada. Los errores relativos son menores del  $5.3 \%$  ( $n=6$ ) en el caso de agua de río y menores del  $4.2 \%$  ( $n=6$ ) en el caso de agua de grifo.

El límite de detección alcanzado para la determinación de amitrol en muestras de agua, teniendo en cuenta la preconcentración conseguida, es de  $5 \mu\text{g L}^{-1}$ . Este límite es superior al establecido por la comunidad europea, pero el método analítico puesto a punto es el primer método desarrollado para la determinación de amitrol por electroforesis capilar en muestras de agua en el cual se alcanzan estos niveles de concentración.

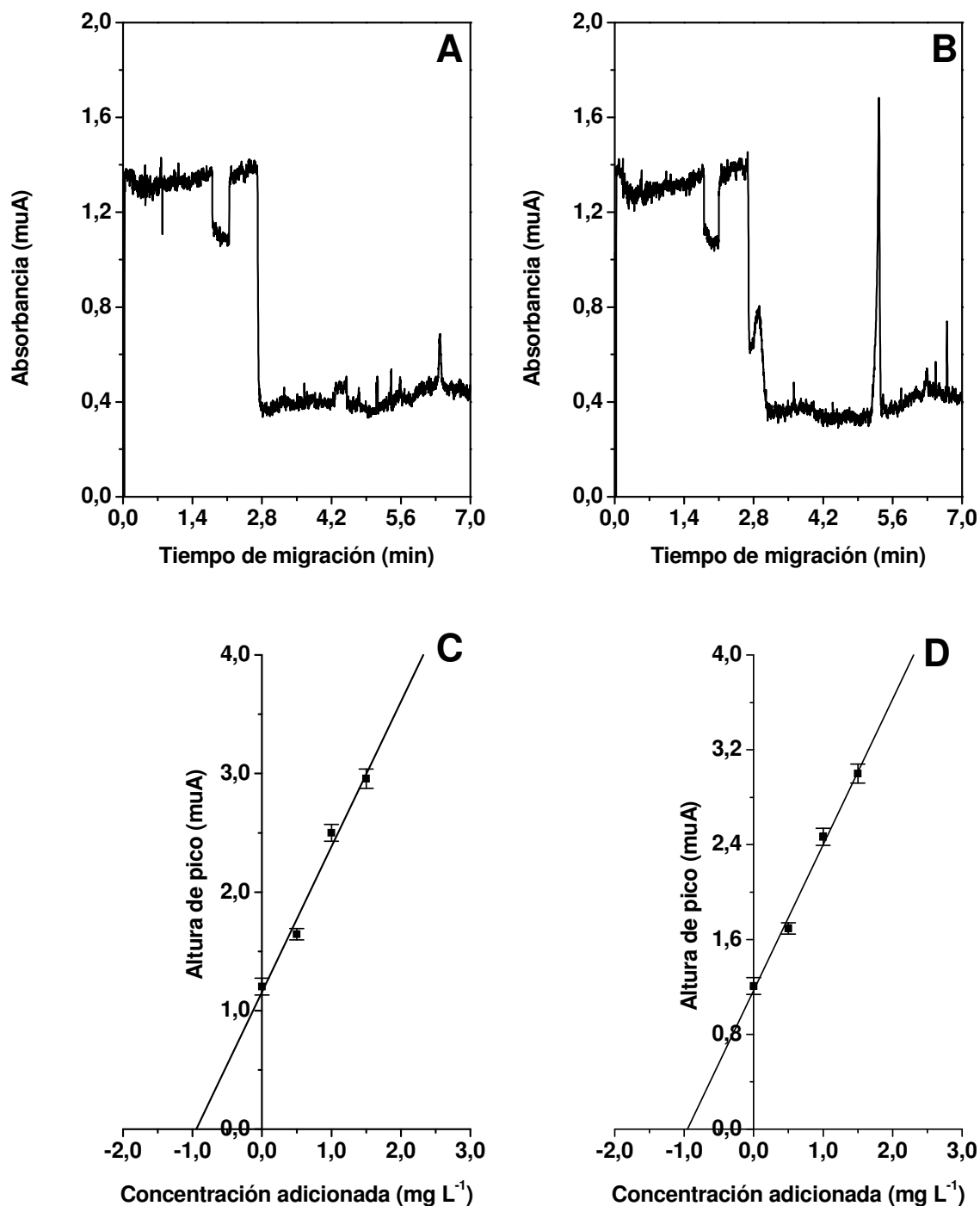


Figura 34.- Electroferogramas correspondientes a la muestra de agua de grifo preconcentrada (A) y muestra de agua de grifo dopada con amitrol al nivel de 0.040 mg L<sup>-1</sup> y preconcentrada (B). Influencia de la concentración de amitrol adicionada en la altura de pico: muestra de agua de río (C) y muestra de agua de grifo (D) dopadas con amitrol al nivel de 0.040 mg L<sup>-1</sup>. Condiciones de medida: condiciones óptimas de separación y detección.





**4.2 SEPARACIÓN Y DETERMINACIÓN DE  
AMITROL Y URAZOL POR ELECTROFORESIS  
CAPILAR DE ZONA CON DETECCIÓN DUAL  
(UV/ELECTROQUÍMICA)**



#### 4.2.1. DETECCIÓN ELECTROQUÍMICA EN ELECTROFORESIS CAPILAR

La detección electroquímica (ED) está basada en las propiedades electroquímicas y eléctricas de analitos y disolución apoyándose en los principios de conductimetría, potenciometría, amperometría o voltamperometría<sup>79</sup>.

En general puede decirse que los detectores electroquímicos presentan cualidades que los hacen idóneos para ser incorporados a los equipos de electroforesis capilar, como son: su perfecta adaptación a las dimensiones físicas de los capilares sin pérdida de sensibilidad y su sencilla y barata instrumentación. A su vez, también presentan inconvenientes, los cuales han hecho que este tipo de detección haya sido escasamente introducida en equipos comerciales, como son: la necesidad de aislar el detector de los elevados voltajes de separación y el hecho de que se requiera un perfecto alineamiento entre la columna y el electrodo de trabajo.

Los tres principales tipos de detección electroquímica utilizados en electroforesis capilar son:

**Detección Conductimétrica:** No se trata realmente de una detección electroquímica pura, puesto que en ella no existe una reacción en superficie entre la disolución-analito y el electrodo, podría decirse que se basa en la medida de una propiedad eléctrica de un fluido entre dos electrodos.

En electroforesis capilar está basada en los cambios de conductividad entre las zonas que migran en el interior de la columna. Tiene la ventaja de que es de carácter universal dado que cualquier ión produce un cambio de conductividad, pero posee la desventaja de que su señal está influenciada por el volumen de la celda de detección, y por lo tanto por las dimensiones internas de la columna capilar<sup>90</sup>.

Con este tipo de detección se han obtenido muy buenas respuestas analíticas en las separaciones de compuestos iónicos<sup>91</sup>. A pesar de ello, no se trata de un sistema de detección demasiado extendido ya que la fabricación de estos detectores es compleja y costosa.

**Detección Potencimétrica:** Se basa en la transferencia selectiva de un ión en disolución dentro de una membrana generalmente de tipo lipofílico, generando una diferencia de potencial entre ambos lados de la membrana, que es proporcional a la concentración del

analito, teniendo en cuenta que según la ecuación de Nerst, la diferencia de potencial, bajo condiciones ideales, está representada por una función lineal del logaritmo de las actividades del ión en ambas disoluciones.

Este tipo de detección fue introducida por primera vez en electroforesis capilar por **Haber y col.**<sup>92</sup> en 1990, y sus principales problemas radican en la fabricación de membranas de un diámetro similar al de los capilares y la alineación de la salida de la columna con los electrodos.

Dado que las membranas están principalmente desarrolladas para responder a iones metálicos, su uso está indicado principalmente a la detección de metales alcalinos, alcalinotérreos y aniones inorgánicos<sup>93,94</sup> aunque también se está empleando en la detección de compuestos orgánicos iónicos<sup>95</sup>.

**Detección Amperométrica:** Se trata de la detección electroquímica más utilizada. Está basada en la medida de la corriente resultante de la oxidación o reducción de sustancias electroactivas en la superficie de un electrodo (electrodo de trabajo) como consecuencia de la aplicación de una diferencia de potencial entre éste y un electrodo de referencia sumergidos ambos en una disolución de electrolito.

La corriente es proporcional al número de electrones intercambiados y a la concentración del analito en la disolución. Este sistema de medida es selectivo, ya que puede discriminar entre sustancias electroactivas (detectables) y no electroactivas (no detectables) e, incluso, seleccionando adecuadamente el potencial aplicado, entre sustancias electroactivas que tengan suficiente diferencia entre sus potenciales redox.

En general para trabajar con esta detección se utiliza una celda amperométrica con tres electrodos, un electrodo de trabajo (donde tiene lugar la reacción electródica), un electrodo de referencia y un electrodo auxiliar.

Los problemas encontrados al acoplar la detección amperométrica a la electroforesis capilar son principalmente dos:

- La necesidad de aislar el detector del alto voltaje de separación. La detección se lleva a cabo al final de la columna y dado que las magnitudes de las corrientes de separación son alrededor de seis ordenes de magnitud superiores a la corriente faradaica que se produce como consecuencia de la reacción electródica, aquellas provocan una elevada interferencia en el correspondiente sistema de detección.

- El modo de alineamiento entre el electrodo y la columna capilar.

Debido al interés de esta técnica de detección y en base a la resolución de estos dos problemas, existe un número considerable de publicaciones científicas en las que se ha empleado este tipo de detección<sup>80</sup>, a pesar de ello la mayoría de los detectores amperométricos descritos, han sido adaptados a equipos de electroforesis capilar contruidos en los laboratorios de investigación. Únicamente existe una celda de detección electroquímica patentada, que si es acoplable a equipos comerciales de electroforesis capilar<sup>96</sup>. Este sistema de detección es compatible con el detector UV-visible que posee el equipo comercial de electroforesis capilar, lo que hace posible la detección dual UV-Visible y electroquímica<sup>97,98</sup>. Esta combinación permite ampliar la cantidad de sustancias detectables y mejorar la sensibilidad y selectividad.

Para la puesta a punto del método de separación y determinación de amitrol, desarrollado en el presente capítulo, se ha empleado como dispositivo de detección electroquímica un diseño mejorado del detector electroquímico patentado en nuestro grupo de investigación<sup>67</sup>. Este detector es perfectamente compatible con el detector UV/Visible del equipo de electroforesis capilar, por lo que es posible realizar la correspondiente detección dual espectrofotométrica y amperométrica en el mismo análisis. Para la optimización de la separación de amitrol y urazol se va ha emplear la detección electroquímica.

Hay que tener en cuenta que, debido al diseño del inyector del equipo comercial, es necesario que exista una distancia mínima entre la ventana de detección UV-visible y el final de la columna capilar de 30 cm. Esta distancia va a generar una diferencia en los tiempos de migración observados en cada modo de detección, puesto que la detección electroquímica se realiza al final de columna (*“off-column”*).

Para aislar el detector electroquímico del alto voltaje del proceso electroforético se ha empleado un *“decoupler”* a 2.0 cm del final de la columna. El *“decoupler”* es un dispositivo que consiste en una fractura que se practica cerca del final de la columna capilar, protegida por un material conductor. Entre estos materiales se ha empleado Nafion<sup>®</sup>, acetato de celulosa, vidrio poroso, paladio o grafito poroso. También existen *“decoupler”* con fracturas libres o fabricados mediante el ataque con ácido fluorhídrico a la pared del capilar<sup>67</sup>. En nuestro caso, en la fabricación del *“decoupler”*, se ha empleado el Nafion<sup>®</sup> como material conductor. Los pasos realizados para la construcción de éste, son los descritos en la sección 3.3.1.B, pág 39, de esta Memoria.

## 4.2.2 ENSAYOS PREVIOS

### A. Electroactividad de los analitos

Antes de iniciar la puesta a punto de la separación electroforética de amitrol y su metabolito urazol, teniendo en cuenta el tipo de detección que se va a emplear, es fundamental conocer el comportamiento electroquímico de los compuestos objeto de estudio.

Como se mostrará en el capítulo siguiente, el amitrol es electroactivo en todo el margen de pH, siendo mayor su sensibilidad en medio ácido. De la misma forma se ha comprobado que el urazol también es electroactivo en todo el margen de pH.

En la figura 35, se muestran los voltamperogramas cíclicos obtenidos de amitrol y urazol en concentración  $1.00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  en tampón acetato  $0.050 \text{ mol L}^{-1}$  de pH 4.5, empleando como electrodo de trabajo un electrodo de "glassy carbon" de 1.0 mm de diámetro.

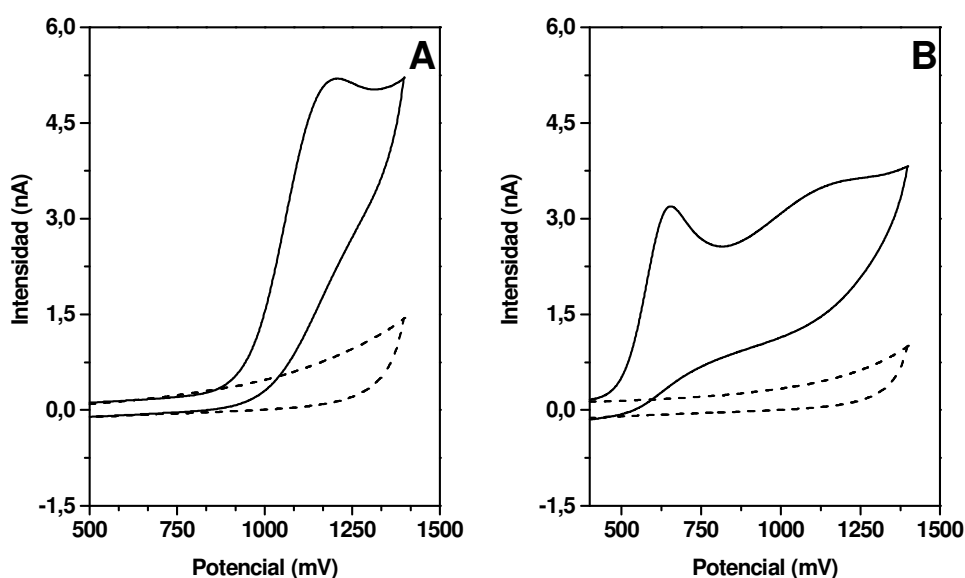


Figura 35.- Voltamperogramas cíclicos de amitrol (A) y urazol (B)  $1.00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  en tampón acetato  $0.050 \text{ mol L}^{-1}$  de pH 4.5. Electrodo de trabajo: de "glassy carbon" (1.0 mm de diámetro); electrodo de referencia: Ag/AgCl/KCl  $3 \text{ mol L}^{-1}$ ; electrodo auxiliar: varilla de platino; velocidad de barrido:  $50 \text{ mV s}^{-1}$ . En línea discontinua se muestra la señal del electrolito soporte.

### 4.2.3 INFLUENCIA DEL ELECTROLITO DE SEPARACIÓN

Como se indica en la sección 4.1.2 (pág. 71), el electrolito de separación juega un papel muy importante en electroforesis capilar, afectando entre otros, a la selectividad y eficacia de la separación.

#### A. Influencia de la naturaleza y pH del tampón de separación

El estudio del pH del medio se realiza para valores de pH comprendidos entre 4.0 y 6.0, teniendo en cuenta:

- Los  $pK_a$  de los compuestos, y fundamentalmente los del amitrol (Tabla 2), el cual se encuentra cargado positivamente a  $pH < 4.2$  (figura 9).
- Los estudios electroquímicos de amitrol descritos en el capítulo siguiente, en los cuales se comprueba que la señal de oxidación de amitrol es mayor a pH ácidos.
- Las características de la separación electroforética con detección electroquímica, donde no es posible trabajar a valores de pH en los cuales no exista flujo electrosmótico, ya que en los últimos 2.0 cm de columna (posteriores al “*decoupler*”) la disolución es empujada hacia la superficie del electrodo como consecuencia de éste.

Para el estudio aquí presentado, se emplean tres electrolitos diferentes: acetato, fosfato y 2-(n-morfolin)etanosulfato (MES). Se preparan disoluciones tampón de estos tres electrolitos en concentración  $0.020 \text{ mol L}^{-1}$  con valores de pH comprendidos entre 4.0 y 6.0. Se registran los electroferogramas de la separación utilizando cada una de las disoluciones tampón preparadas, aplicando un voltaje de 25.0 kV e introduciendo la muestra, de amitrol y urazol en concentración 3.0 y  $4.0 \text{ mg L}^{-1}$  respectivamente, en modo hidrodinámico durante 2.00 s. Para la detección electroquímica se llena la celda de detección con el tampón de separación. Como electrodo de trabajo se emplea un electrodo de “*glassy carbon*” de 1.0 mm de diámetro. El potencial de detección se fija en 950 mV.

Durante la realización de este estudio se observa que:

- No es posible llevar a cabo la separación empleando tampón MES como tampón de separación, ya que en ambos tipos de detección (amperométrica y UV), los

electroferogramas obtenidos muestran una gran caída en la señal de fondo. Esta caída coincide a valores de pH bajos con la señal analítica de urazol y a valores de pH altos con la del amitrol.

- La separación empleando el tampón fosfato solo es posible para un margen de pH comprendido entre 5.5 y 6.0 y con muy poca reproducibilidad. A pH inferiores a 5.5, la señal analítica de ambos compuestos con detección electroquímica disminuye al aumentar el número de análisis, desapareciendo ambas señales al tercer análisis, debido muy probablemente al envenenamiento del electrodo. Además a pH mayores de 6.0 la señal analítica de amitrol se desdobra en dos picos, cuando se emplea la detección electroquímica.

La figura 36 muestra la evolución de los tiempos de migración y altura de pico en el estudio realizado en tampón acetato 0.020 mol L<sup>-1</sup> para el margen de pH estudiado.

A la vista de los resultados obtenidos se elige como medio de separación para posteriores estudios, tampón acetato de pH 4.5. A este pH, como se observa en la figura 36, es donde se obtiene una mayor sensibilidad para ambos compuestos.



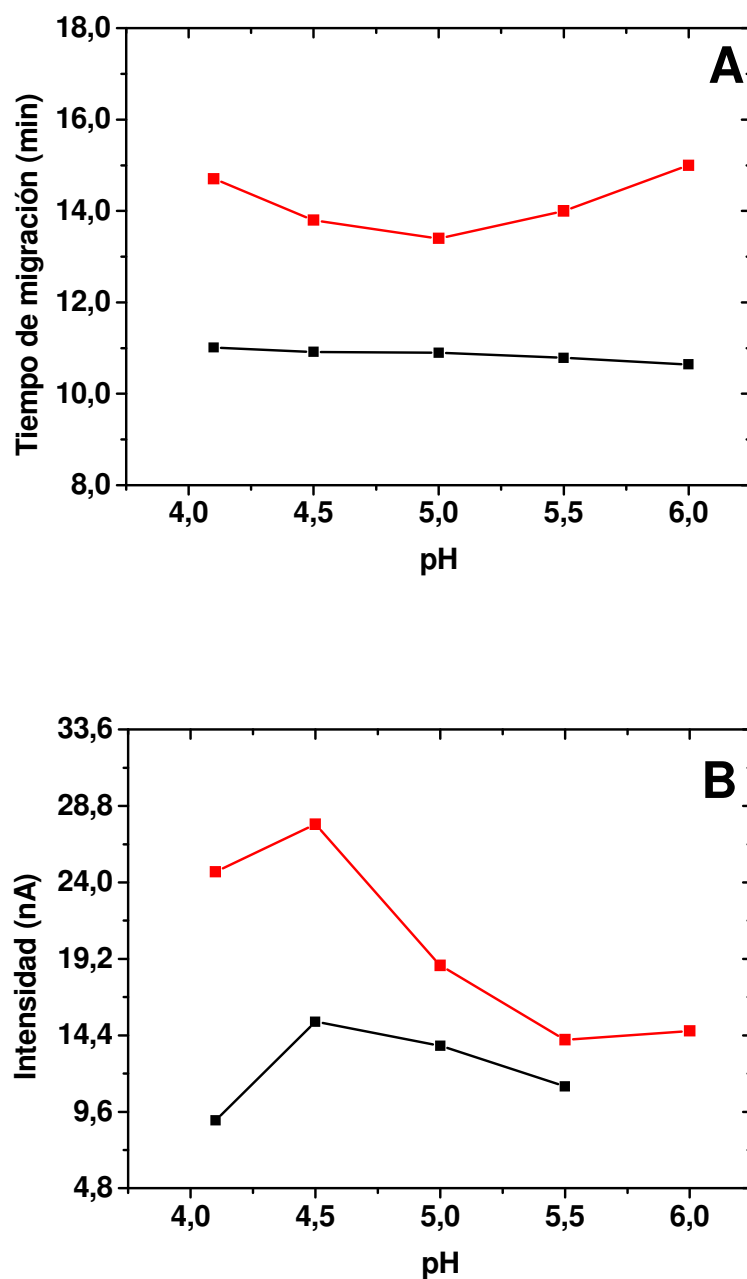


Figura 36.- Evolución de los tiempos de migración (A) y altura de pico (B) con el pH de amitrol (■) y urazol (■) en concentración 3.0 y 4.0 mg L<sup>-1</sup> respectivamente. Medio de medida: acetato 0.020 mol L<sup>-1</sup>, Voltaje de separación: 25.0 kV; introducción de muestra hidrodinámica durante 2.00 s; longitud de la columna capilar: 100 cm; electrolito en celda electroquímica: electrolito de separación; electrodo de trabajo: de "glassy carbón" de 1.0 mm de diámetro; potencial de detección: 950 mV.

## **B. Influencia de la concentración**

Para la realización de este estudio se utilizan disoluciones acuosas de amitrol y urazol en concentración 3.0 y 4.0 mg L<sup>-1</sup> respectivamente. Las separaciones se llevan cabo en tampón acetato de pH 4.5 en concentración comprendida entre 0.010 y 0.075 mol L<sup>-1</sup>, aplicando un voltaje de separación de 25.0 kV e introduciendo la muestra en modo hidrodinámico durante 2.00 s. La detección amperométrica se realiza en tampón acetato 0.050 mol L<sup>-1</sup> de pH 4.5 aplicando un voltaje de 950 mV sobre un electrodo de “*glassy-carbon*”.

La figura 37 muestra los electroferogramas obtenidos en tampón acetato de varias concentraciones ajustadas todas ellas a pH 4.5.

En la figura 38 se observa que el aumento en la concentración del tampón causa un incremento en el tiempo de migración de ambos compuestos. La representación de los tiempos de migración frente a la raíz cuadrada de la concentración es lineal hasta una concentración de 0.050 mol L<sup>-1</sup>. Este resultado indica que no es posible trabajar a concentraciones mayores de 0.050 mol L<sup>-1</sup>, puesto que no estaríamos trabajando en condiciones ideales de separación electroforética<sup>82</sup>.

Buscando un compromiso entre sensibilidad y tiempo de análisis, se estima que una concentración 0.030 mol L<sup>-1</sup> de electrolito, es la más idónea para estudios posteriores.

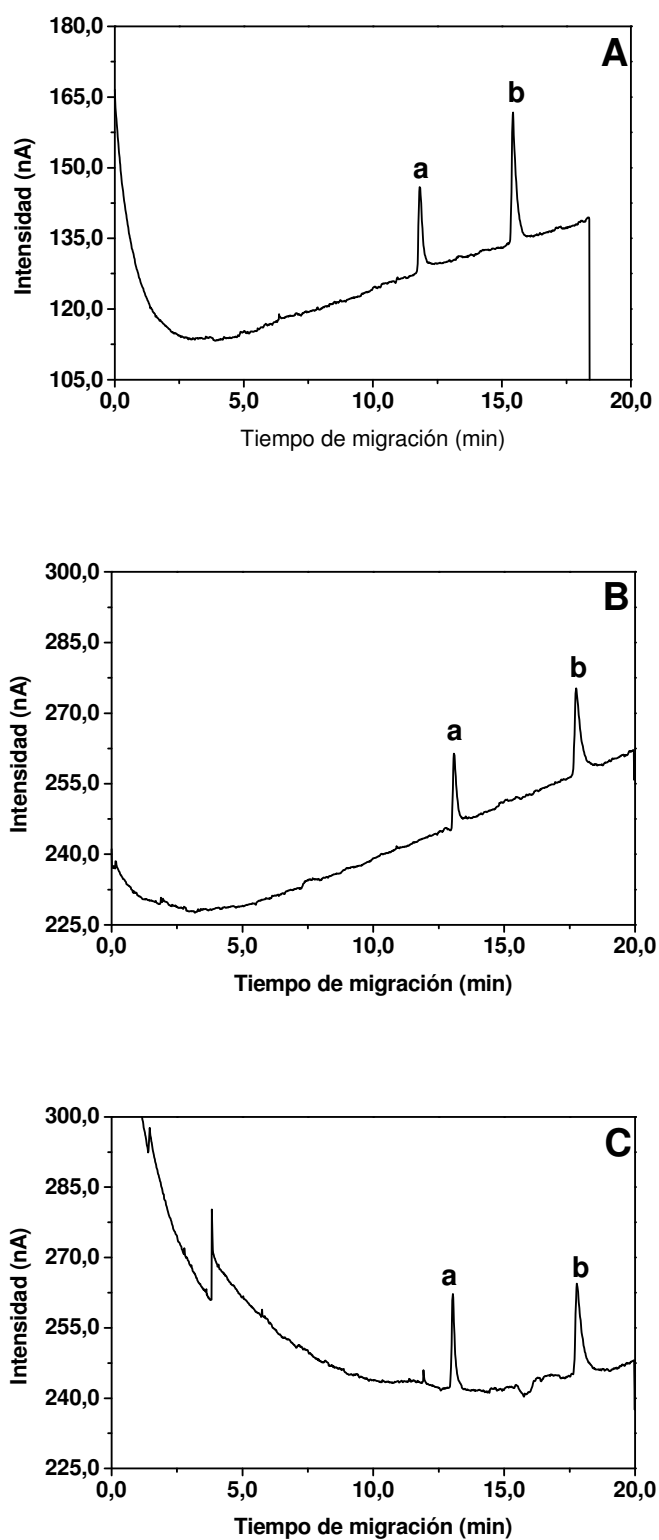


Figura 37.- Electroferogramas a diferentes concentraciones de tampón acetato de pH 4.5: 0.030 (A), 0.050 (B) y 0.075 mol L<sup>-1</sup> (C) ; para amitrol (a) y urazol (b) en concentración 3.0 y 4.0 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. Electrolito en celda electroquímica: tampón acetato 0.050 mol L<sup>-1</sup> de pH 4.5. Resto de condiciones en figura 36.

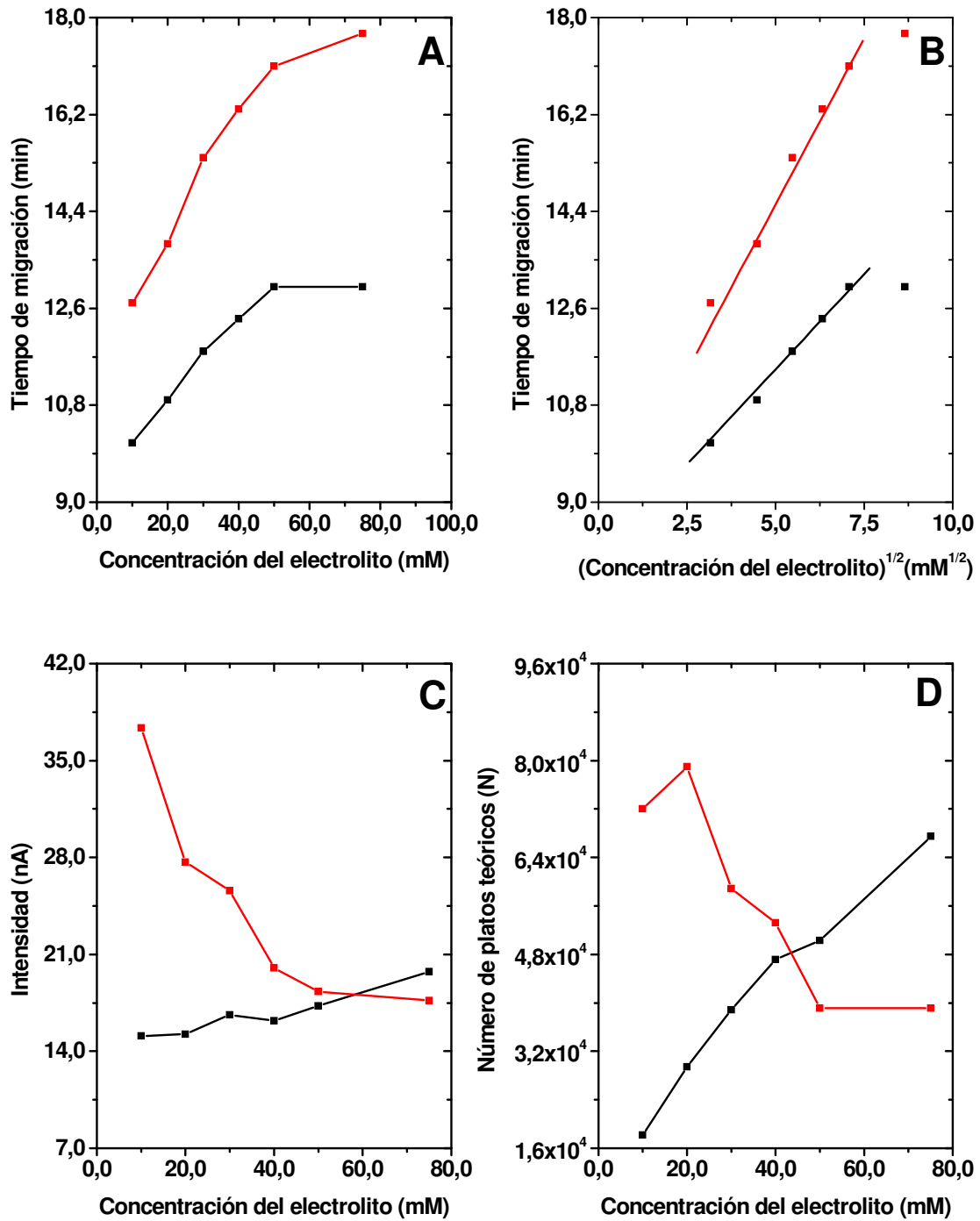


Figura 38-. Evolución de los tiempos de migración (A), intensidad de pico (C) y número de platos teóricos (D) con la concentración del electrolito de separación y evolución del tiempo de migración con la raíz cuadrada del mismo (B) para amitrol (■) y urazol (■). Resto de condiciones igual que en figura 37.

#### 4.2.4 INFLUENCIA DEL VOLTAJE DE SEPARACIÓN

El voltaje de separación influye en los tiempos de migración y por lo tanto en la resolución y eficacia de la separación (sección 4.1.3, pág. 78).

Por otra parte y cuando se emplea la detección amperométrica, este voltaje puede afectar también a la señal eléctrica que proporciona el detector<sup>67</sup> ya que:

- El tiempo de migración es inversamente proporcional al voltaje de separación. En nuestro caso, la presencia de un “*decoupler*” puede alterar este comportamiento, pues en los últimos 2 cm, posteriores al “*decoupler*”, el desplazamiento de los analitos no es debido exclusivamente al voltaje.
- Cuando se utiliza un sistema de detección amperométrico, la señal puede verse afectada por la corriente de separación, aumentando proporcionalmente la magnitud de la señal de fondo con el voltaje de separación. Es de máxima importancia que el “*decoupler*” aisle de manera efectiva al detector de estas corrientes para tener un funcionamiento correcto.

El estudio se realiza con disoluciones de amitrol y urazol de concentración 3.0 y 4.0 mg L<sup>-1</sup> respectivamente, en disolución acuosa, usando como electrolito de separación tampón acetato 0.030 mol L<sup>-1</sup> de pH 4.5 y como electrolito en la celda electroquímica, tampón acetato 0.050 mol L<sup>-1</sup> de pH 4.5, a temperatura ambiente. La introducción de muestra se realiza de modo hidrodinámico durante 2.00 s. El potencial de detección aplicado es de 950 mV, sobre un electrodo de “*glassy carbon*” de 1.0 mm de diámetro, como electrodo de trabajo.

En la figura 39 se muestra la evolución de los tiempos de migración, altura de pico y número de platos teóricos, en función del voltaje de separación aplicado para el caso de la detección amperométrica.

Como puede observarse en la figura 39, los tiempos de migración de ambos compuestos disminuyen con el aumento del voltaje aplicado. Al mismo tiempo la altura de pico de ambos aumenta hasta un valor de 25.0 kV. Teniendo en cuenta esto, junto a que las corrientes de separación registradas, únicamente son proporcionales al voltaje de separación para valores de éste inferiores o iguales a 25.0 kV, se estima como voltaje de separación óptimo para posteriores estudios, 25.0 kV.

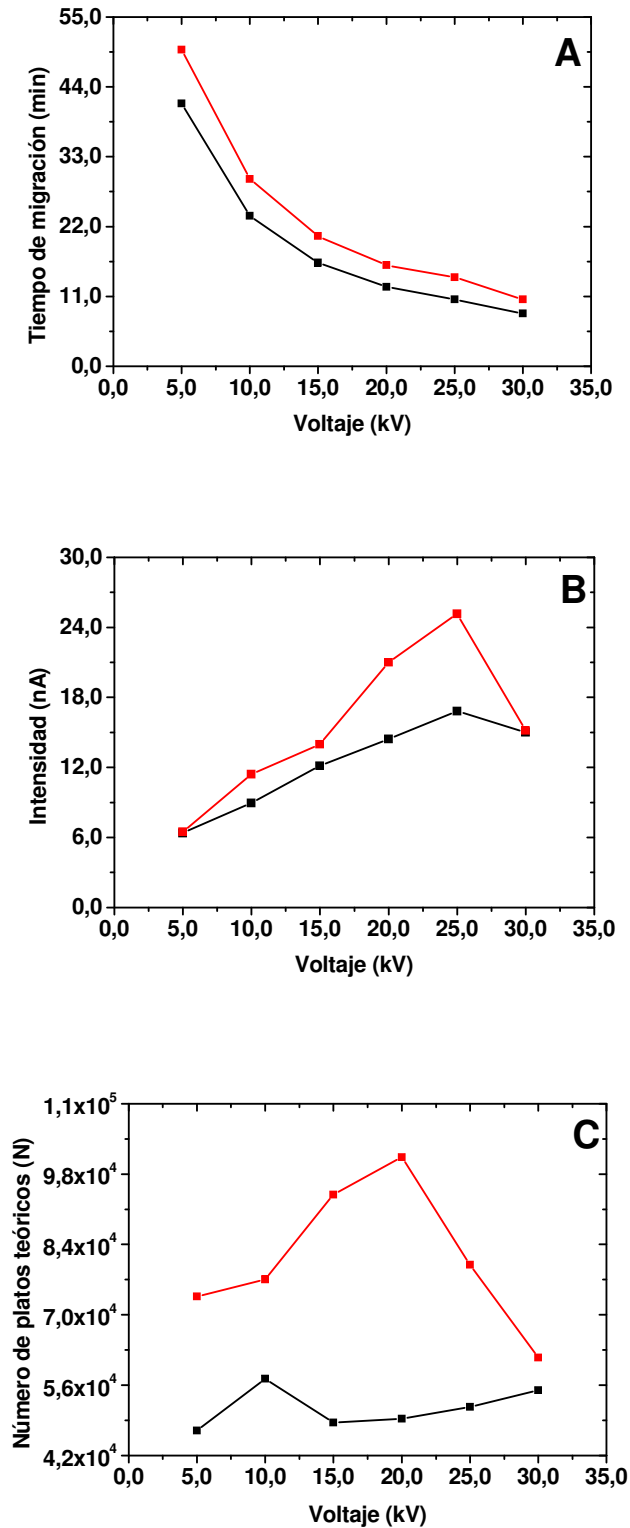


Figura 39.- Evolución de tiempo de migración (A), intensidad de pico (B), y número de platos teóricos (C) con el voltaje de separación de amitrol (■) y urazol (■). Medio de medida: tampón acetato 0.030 mol L<sup>-1</sup> de pH 4.5, resto de condiciones igual que en figura 36.

#### **4.2.5 LONGITUD DE LA COLUMNA CAPILAR**

Dada la buena resolución que existe y con objeto de disminuir los tiempos de análisis se procede a la reducción de la longitud de la columna capilar. Este proceso está limitado por la resolución en la separación, el aumento en la corriente de separación y la configuración del inyector del equipo de electroforesis capilar utilizado.

Para la realización del estudio, se acorta la longitud de la columna de 100 hasta 75 cm, siendo imposible acoplar en el inyector columnas de menor longitud. La diferencia inicial de 32 cm en las longitudes efectivas para la detección UV y amperométrica se mantiene constante durante todo el estudio.

Con la disminución de la longitud de la columna se observa una disminución en los tiempos de migración de ambos compuestos. La intensidad de pico aumenta ligeramente y la eficacia de la separación disminuye, dado que la disminución en los tiempos de migración es más acusada que la observada en las anchuras de pico.

En vista de los resultados obtenidos, se opta por fijar una longitud de la columna capilar de 92 cm, buscando un compromiso entre tiempos de migración y eficacia de separación.

#### **4.2.6 ESTUDIOS DE INTRODUCCIÓN DE MUESTRA**

El volumen de muestra que se introduce en el sistema, influye en la sensibilidad de la señal analítica en detección UV y en la detección amperométrica. Volúmenes de muestra grandes suponen mayores señales, pero dan lugar, generalmente, a menores valores en resolución y en eficacia de la separación como consecuencia del ensanchamiento de los picos.

En este apartado de la Memoria, se elige como modo de introducción de muestra el hidrodinámico ya que con el modo electrocinético la reproducibilidad es menor, como se ha comprobado en la metodología puesta a punto, descrita en el apartado anterior.

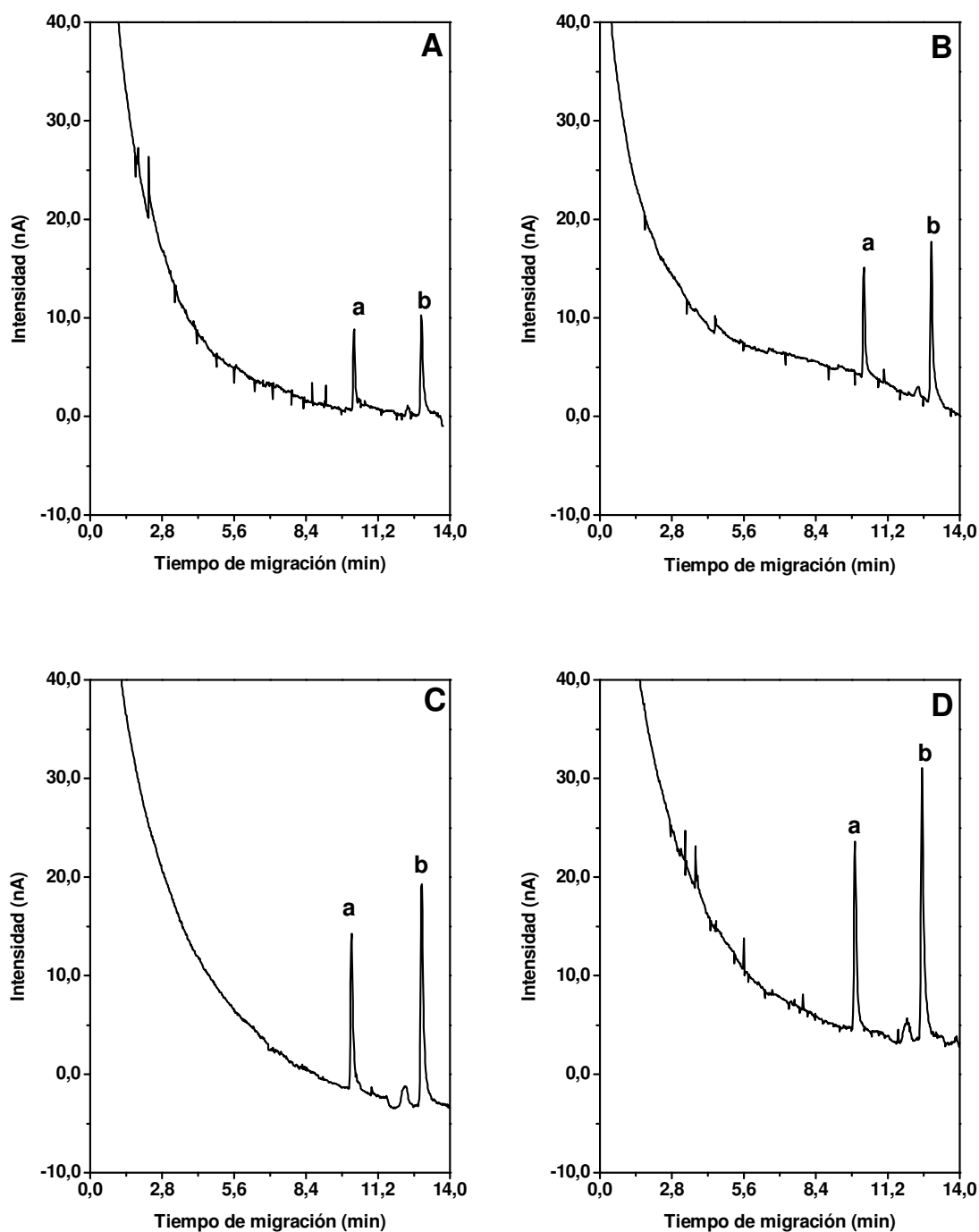
El estudio se realiza a dos concentraciones diferentes de ambos compuestos, el primer estudio se realiza con disoluciones de concentraciones 3.0 y 4.0 mg L<sup>-1</sup> de amitrol y urazol respectivamente, y el segundo para una concentración 0.5 y 0.6 mg L<sup>-1</sup> de amitrol y urazol respectivamente. Como tampón de separación se utiliza tampón acetato 0.030 mol L<sup>-1</sup> de pH 4.5 y se aplica un voltaje de separación de 25.0 kV. La detección amperométrica se realiza en tampón acetato 0.050 mol L<sup>-1</sup> de pH 4.5, aplicando un potencial de 950 mV sobre un electrodo de trabajo de "glassy carbon" de 1.0 mm de diámetro.

La figura 40 muestra los electroferogramas correspondientes a una concentración de 3.0 y 4.0 mg L<sup>-1</sup> de amitrol y urazol respectivamente.

Para ambas concentraciones, como se observa en las figuras 41 y 42, la altura de pico varía linealmente para tiempos de introducción de muestra por debajo de 1.5 s. Es importante destacar también el ensanchamiento producido en los picos para tiempos mayores, con la consiguiente disminución de la eficacia de la separación.

A la vista de los resultados obtenidos, se elige 1.5 s como tiempo de introducción óptimo para posteriores estudios, resultando un volumen de muestra introducido de 49 nL, calculado a partir de la ecuación de Poiseuille (expresión 18, pág 58).





**Figura 40- Introducción de muestra hidrodinámica a diferentes tiempos de introducción: 0.75 (A), 1.00 (B), 1.50 (C) y 2.00 s (D). Amitrol (a) y urazol (b) en concentraciones de 3.0 y 4.0 mg L<sup>-1</sup> respectivamente.** Electrolito de separación: tampón acetato 0.030 mol L<sup>-1</sup> de pH 4.5, voltaje de separación: 25.0 kV, longitud de la columna capilar: 92 cm, electrolito en celda electroquímica: tampón acetato 0.050 mol L<sup>-1</sup> de pH 4.5, electrodo de trabajo: de "glassy carbon", potencial de detección: 950 mV.

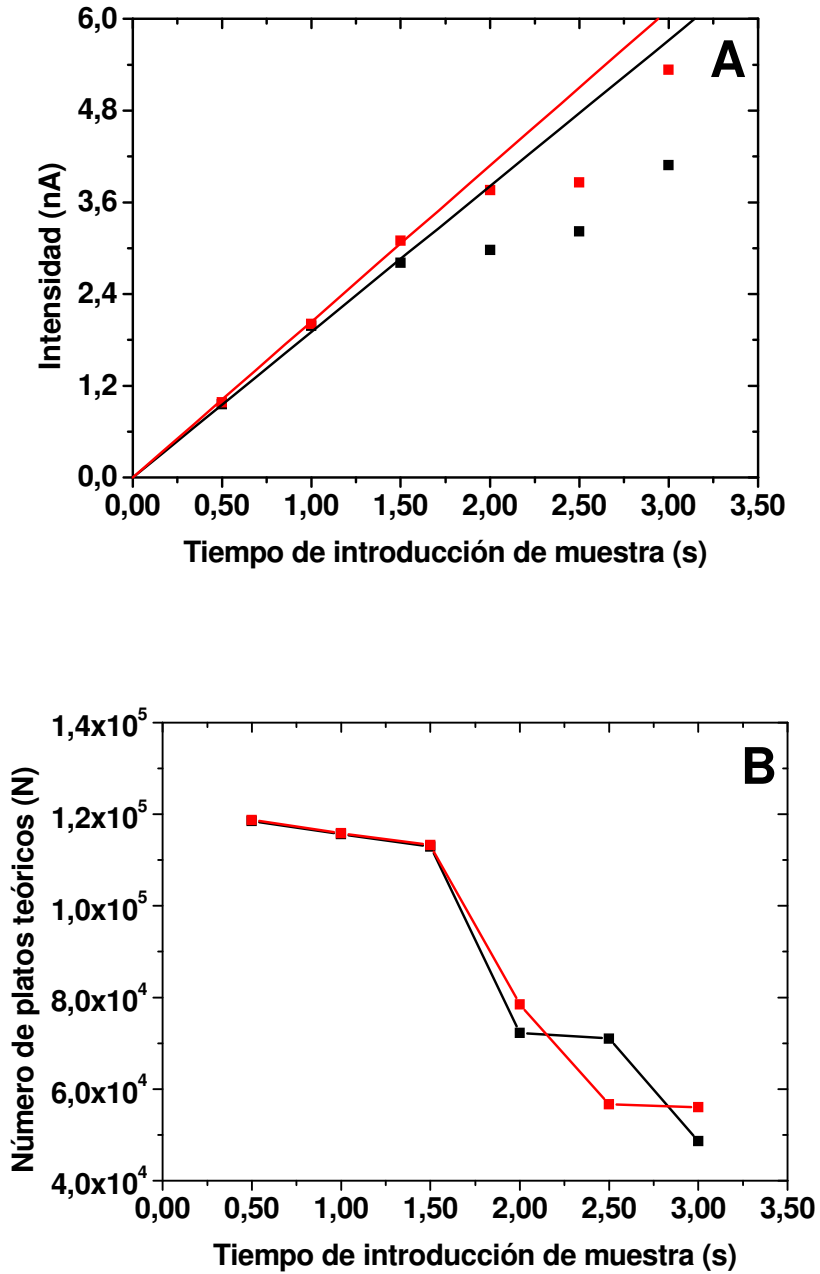


Figura 41.- Evolución de la altura de pico (A) y número de platos teóricos (B) con el tiempo de introducción de muestra. Amitrol (■) y urazol (■) en concentración 0.5 y 0.6 mg L<sup>-1</sup> respectivamente. Resto de condiciones igual que en figura 40.

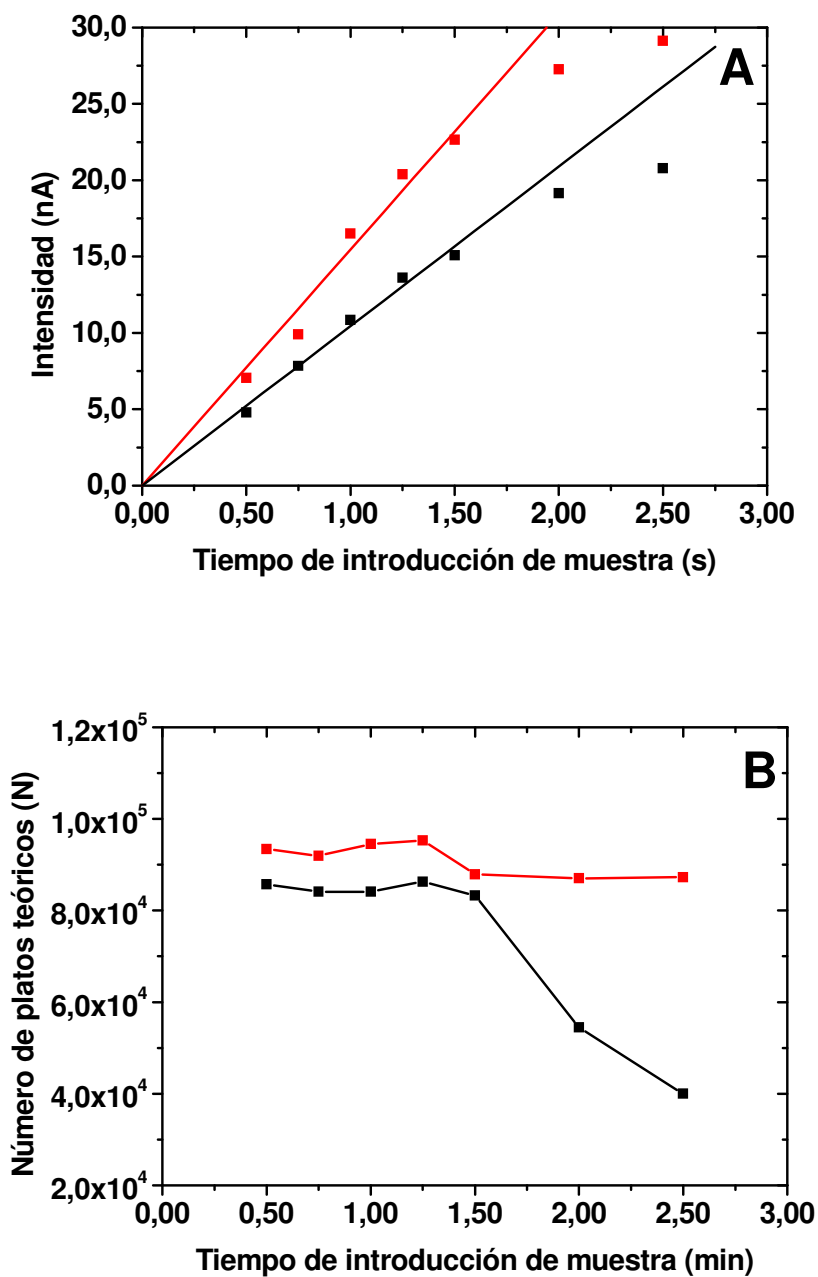


Figura 42.- Evolución de la altura de pico (A) y número de platos teóricos (B) con el tiempo de introducción de muestra. Amitrol (■) y urazol (■) en concentración 3.0 y 4.0 mg L<sup>-1</sup> respectivamente. Resto de condiciones igual que en figura 40.

A continuación, se realiza un estudio de la reproducibilidad en la introducción de la muestra. El estudio se realiza a dos concentraciones diferentes de los herbicidas. El electrodo de trabajo se pule entre análisis.

En la tabla 15 se muestran los resultados obtenidos para una concentración de 3.0 y 4.0 mg L<sup>-1</sup> de amitrol y urazol y en la tabla 16 los obtenidos para una concentración de 0.5 y 0.6 mg L<sup>-1</sup> de amitrol y urazol respectivamente.

Tabla 15.- Reproducibilidad en la introducción de muestra.  
Amitrol: 3.0 mg L<sup>-1</sup> y urazol: 4.0 mg L<sup>-1</sup>

<b>Muestra N<sup>o</sup></b>	<b>Compuestos</b>	<b>Tiempo de migración (min)</b>	<b>Altura de pico (nA)</b>
<b>1</b>	amitrol	9.9	19.1
	urazol	12.5	25.5
<b>2</b>	amitrol	10.0	18.2
	urazol	12.5	22.5
<b>3</b>	amitrol	9.9	19.4
	urazol	12.6	22.0
<b>4</b>	amitrol	10.2	19.7
	urazol	13.1	26.2
<b>5</b>	amitrol	10.4	17.0
	urazol	13.4	22.1
<b>6</b>	amitrol	10.2	16.1
	urazol	12.9	22.4
<b>7</b>	amitrol	10.2	14.4
	urazol	12.9	24.8
<b>8</b>	amitrol	10.8	14.7
	urazol	13.7	18.6
<b>DER (%)</b>	<b>amitrol</b>	<b>2.9</b>	<b>11.8</b>
	<b>urazol</b>	<b>3.1</b>	<b>8.7</b>

Tabla 16.- Reproducibilidad en la introducción de muestra

Amitrol: 0.5 mg L<sup>-1</sup> y urazol: 0.6 mg L<sup>-1</sup>

Muestra N <sup>a</sup>	Compuestos	Tiempo de migración (min)	Altura de pico (nA)
1	amitrol	10.5	2.4
	urazol	13.4	3.1
2	amitrol	10.1	2.2
	urazol	12.7	2.7
3	amitrol	9.9	3.0
	urazol	12.5	4.2
4	amitrol	9.9	2.7
	urazol a	12.4	3.4
5	amitrol	9.9	2.6
	urazol	12.4	2.9
6	amitrol	9.9	2.9
	urazol	12.5	3.0
7	amitrol	9.9	2.5
	urazol	12.5	2.6
8	amitrol	9.9	2.6
	urazol	12.6	2.6
DER (%)	<b>amitrol</b>	<b>2.0</b>	<b>11.1</b>
	<b>urazol</b>	<b>2.4</b>	<b>16.7</b>

En ambos casos se encuentran desviaciones estándar relativas inferiores al 3.1 % en tiempo de migración e inferiores al 16.7 % en el caso de la altura de pico.

#### **4.2.7 OPTIMIZACION DE LA SEÑAL AMPEROMÉTRICA**

Una vez puesto a punto el método de separación, se pasa a estudiar las condiciones óptimas de detección.

Es habitual que en los procesos electroquímicos de sustancias orgánicas estén involucrados intercambios con protones en el medio. Como consecuencia de ello, el pH del medio influye decisivamente en el potencial e intensidad de estos procesos.

Hay que tener en cuenta que para variar el pH en la vecindad de la superficie del electrodo, el tampón de separación, cuando llega a la celda electroquímica, debe mezclarse e interaccionar con el tampón que llena la celda de detección para hacer efectivo el cambio de pH. Por ello es de esperar que las mayores variaciones en la señal analítica se den al utilizar en la celda de detección disoluciones tampón de valores de pH extremos<sup>67</sup>.

A la vista de los resultados obtenidos en el estudio electroquímico de amitrol descrito en el capítulo siguiente, la intensidad de la señal anódica de amitrol disminuye con el aumento del pH, y su potencial de pico se desplaza a valores menores. Por ello se realiza el estudio del pH del medio de detección empleando disoluciones de tampón Britton-Robinson de pH comprendido entre 2.0 y 5.0. Los resultados no muestran ninguna mejora al compararlos con los obtenidos en tampón acetato de pH 4.5, utilizado hasta el momento. Ésto es debido a que no debe producirse variación alguna del pH en la vecindad del electrodo, por ello se decide seguir utilizando tampón acetato 0.050 mol L<sup>-1</sup> de pH 4.5 en la celda de detección.

El potencial de detección es la variable que ejerce un mayor efecto sobre la señal amperométrica, afectando tanto a la sensibilidad como a los límites de detección del método. Para la determinación del potencial de detección es necesaria la realización de los voltamperogramas hidrodinámicos de los compuestos.

La selección del electrodo de trabajo es también decisiva. En este trabajo, se han realizado los voltamperogramas hidrodinámicos utilizando dos electrodos de diferente naturaleza tomando como base el carbono, un electrodo de "glassy carbon" de 1.0 mm de diámetro y un electrodo de grafito de 0.9 mm de diámetro, preparados como se indica en la sección 3.3.1.B (pág 38). Estos estudios se llevan a cabo en medio acetato 0.050 mol L<sup>-1</sup> de pH 4.5 para una concentración de 1.0 y 1.2 mg L<sup>-1</sup> de amitrol y urazol respectivamente. La figura 43 muestra los voltamperogramas hidrodinámicos obtenidos.

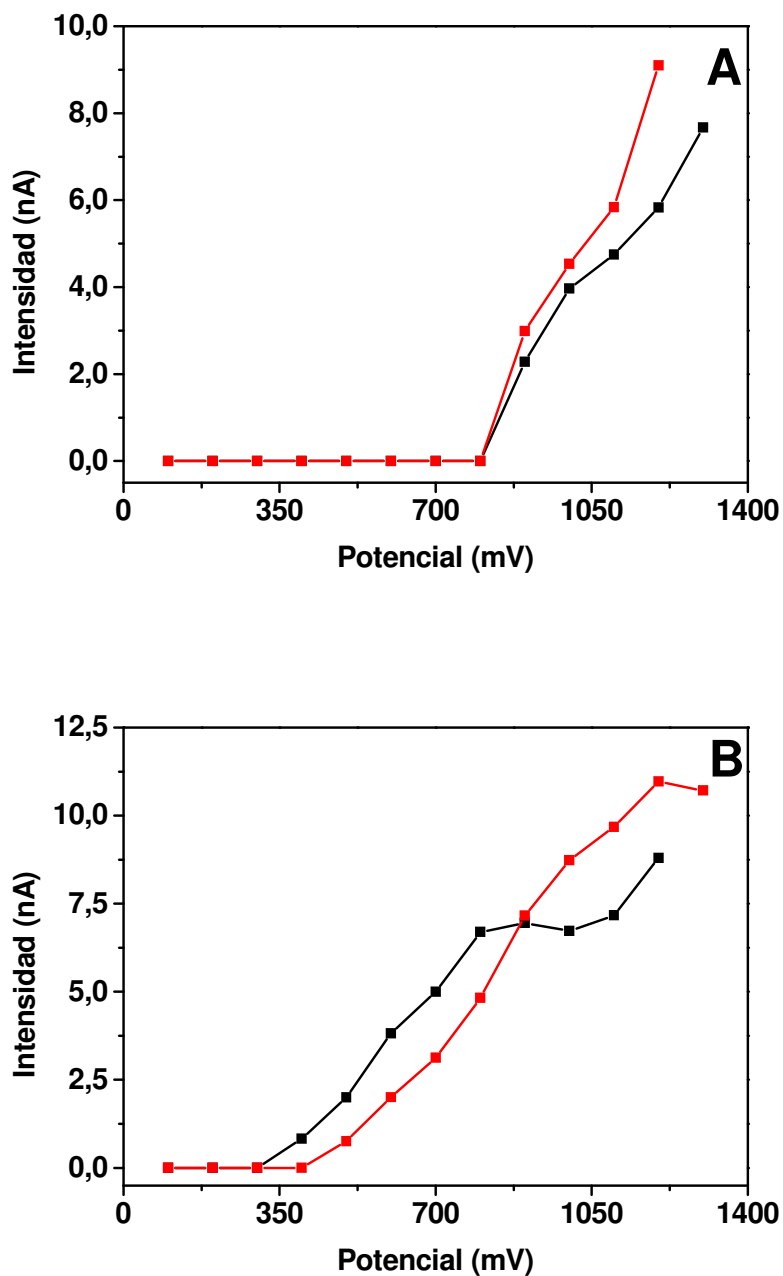


Figura 43.- Voltamperogramas hidrodinámicos de amitrol (A) y urazol (B) en electrodo de "glassy carbon" de 1.0 mm de diámetro (■) y en electrodo de disco de grafito de 0.9 mm de diámetro (■) para una concentración de  $1.0 \text{ mg L}^{-1}$  y  $1.2 \text{ mg L}^{-1}$  de amitrol y urazol respectivamente, en medio tampón acetato  $0.050 \text{ mol L}^{-1}$  de pH 4.5. Condiciones óptimas de separación.

En el caso del amitrol, el perfil hidrodinámico que muestra la oxidación es muy parecido, en ambos electrodos, obteniéndose una intensidad ligeramente superior con el electrodo de disco de grafito.

En cuanto a la señal de oxidación del urazol, éste se oxida más fácilmente en el electrodo de "*glassy carbon*" comenzando su oxidación 100 mV antes que en el electrodo de grafito, pero la corriente alcanzada con éste último a potenciales mayores es superior a la alcanzada con el electrodo de "*glassy carbon*".

En base a los voltamperogramas hidrodinámicos obtenidos se elige 1050 mV como potencial de detección a aplicar al electrodo de trabajo, independientemente de su naturaleza.

A continuación se estudia la repetitividad y estabilidad de ambos electrodos. Para ello, se realizan una serie de diez análisis de una muestra de concentración 1.0 y 1.2 mg L<sup>-1</sup> de amitrol y urazol respectivamente, sin realizar un pulido de la superficie del electrodo entre análisis.

Como puede observarse en la figura 44, los electroferogramas consecutivos de cada uno de los electrodos muestran una clara pérdida de señal en el caso del electrodo de "*glassy carbon*" para el urazol, que puede evaluarse en una pérdida del 52 % en los primeros 45 minutos (3 análisis). En el electrodo de grafito, la señal de ambos compuestos se mantiene estable durante 150 min (10 análisis), resultando una desviación estándar relativa del 9.0 % y 6.2 % para el amitrol y el urazol respectivamente (n = 10). Por otra parte el ruido es también menor en este electrodo.

En base a esto, se elige el electrodo de disco de grafito para posteriores estudios dado que permite trabajar sin necesidad de pulir el electrodo entre diferentes análisis.



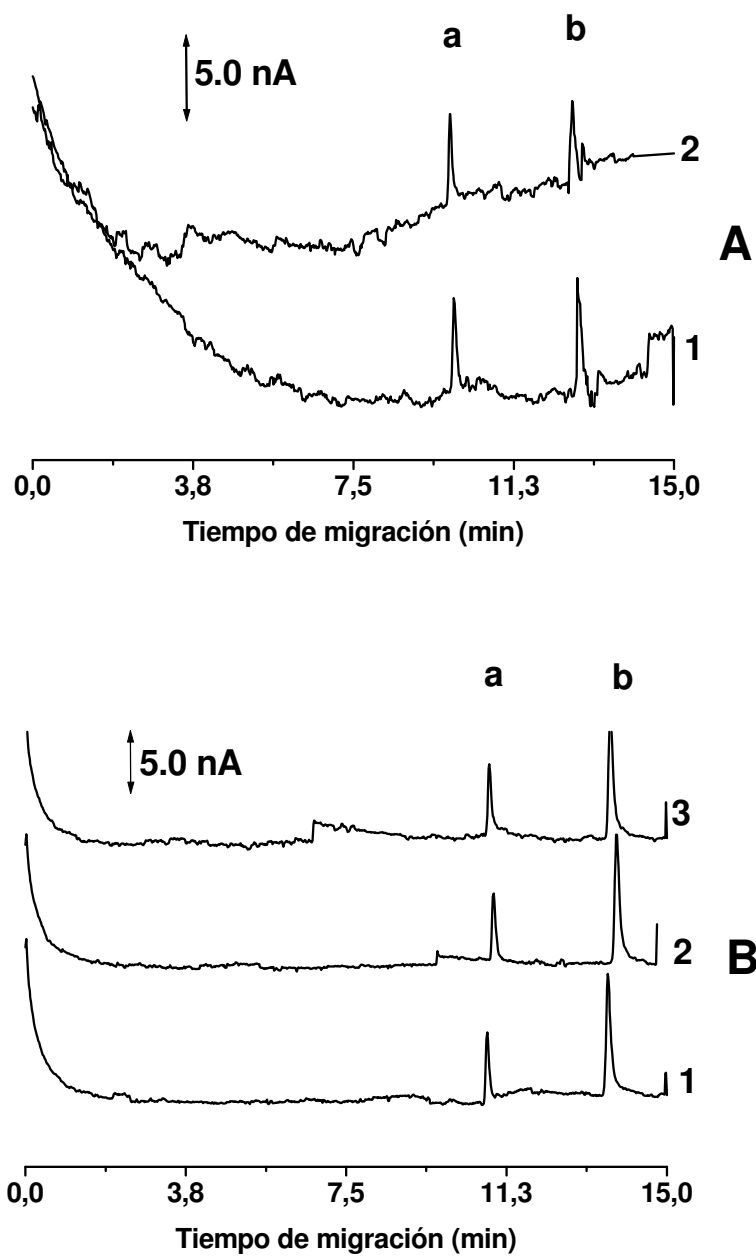
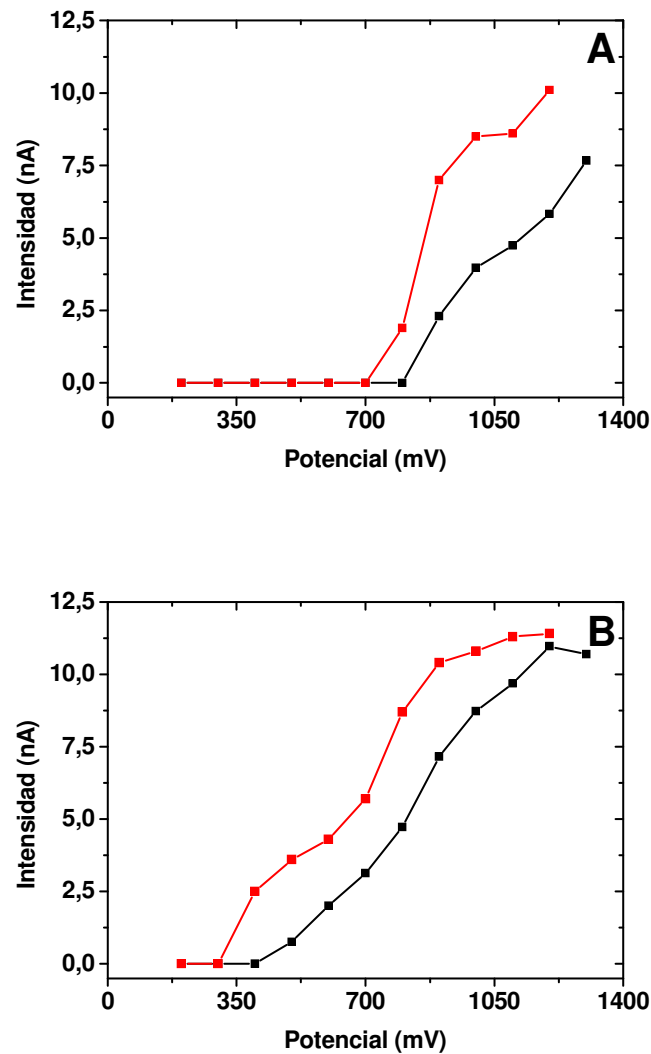


Figura 44.-Electroferogramas consecutivos en electrodo glassy carbon (A) y mina de grafito (B) para una concentración  $1.0 \text{ mg L}^{-1}$  de amitrol (a) y  $1.2 \text{ mg L}^{-1}$  de urazole (b). Potencial de detección  $1050 \text{ mV}$ . Condiciones óptimas de separación.

Considerando que los pretratamientos de las superficies de carbono en general mejoran la señal de oxidación para diferentes compuestos<sup>99</sup>, se estudia la influencia de un pretratamiento potencioestático, que consiste en aplicar 1500 mV durante 1.0 min al electrodo de trabajo, en medio hidróxido sódico 0.1 mol L<sup>-1</sup>.

En la figura 45, se muestran los voltamperogramas hidrodinámicos de ambos compuestos en un electrodo de disco de grafito activado y sin activar.



**Figura 45-. Voltamperogramas hidrodinámicos de amitrol (A) y urazole (B) en concentración 1.0 mg L<sup>-1</sup> y 1.2 mg L<sup>-1</sup> respectivamente, en electrodo de grafito sin activar (■) y activado potencioestáticamente (■). Condiciones óptimas de separación.**

Puede observarse que el pretratamiento previo al electrodo de trabajo favorece la oxidación de ambos compuestos.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se decide emplear un electrodo de trabajo de disco de grafito de 0.9 mm de diámetro, pretratado potencioestáticamente por aplicación de un potencial de 1500 mV durante 1.0 min en NaOH 0.1 mol L<sup>-1</sup>.

Alcanzado este punto, se establecen las condiciones óptimas para la separación y detección de amitrol y urazol por CZE con detección dual (UV-Amperométrica), que quedan reflejadas en la tabla 17.

Tabla 17.- Condiciones óptimas de separación y detección de amitrol y urazol por CZE-UV/amperométrica

<b>SEPARACIÓN</b>	<b>Electrolito de separación:</b> tampón acetato 0.030 mol L <sup>-1</sup> , pH 4.5	
	<b>Voltaje de separación:</b> 25.0 kV	
	<b>Introducción de muestra:</b> hidrodinámica durante 1.50 s	
	<b>Longitud de la columna capilar:</b> 92 cm	
<b>DETECCIÓN</b>	<b>UV</b>	<b>Longitud de onda:</b> 200 nm
	<b>Amperométrica</b>	<b>Electrolito:</b> tampón acetato 0.050 mol L <sup>-1</sup> , pH 4.5
		<b>Electrodo:</b> disco de grafito de 0.9 mm de diámetro activado potencioestáticamente a 1500 mV durante 1 minuto en NaOH 0.1 mol L <sup>-1</sup> .
		<b>Potencial de detección:</b> 1050 mV

En la figura 46 se muestra los electroferogramas obtenidos, bajo las condiciones de separación y detección óptimas establecidas, con ambos tipos de detección.

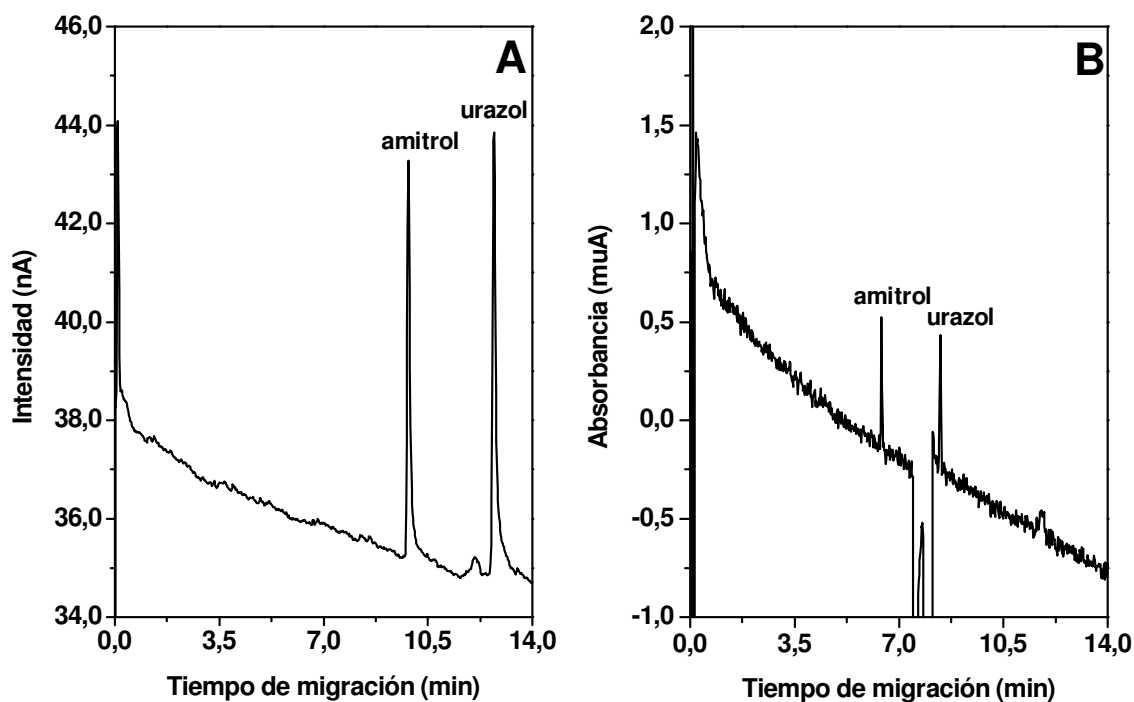


Figura 46.- Electroferogramas de amitrol y urazol en concentración  $1.0$  y  $1.2 \text{ mg}^{-1}$  respectivamente, bajo condiciones óptimas de separación, para detección electroquímica utilizando un electrodo de disco de grafito activado, aplicando un potencial de detección de  $1050 \text{ mV}$  (A) y para detección UV a una longitud de onda de detección de  $200 \text{ nm}$  (B).

Bajo condiciones óptimas de separación, se evalúan las movilidades electroforéticas de ambos compuestos y la movilidad del flujo electrosmótico. Para ello se realizan diez análisis diferentes, de una muestra que contiene ambos compuestos en concentración  $1.0 \text{ mg L}^{-1}$ , en disolución acuosa. Para el cálculo de las movilidades se toman los valores de los tiempos de migración de los dos analitos a partir de los electroferogramas obtenidos con detección UV. En estos electroferogramas se observa una caída en la señal que coincide con la llegada del bolo de muestra, esta caída de señal se debe a que el tampón empleado en la separación presenta absorbancia a la longitud de onda de medida. El tiempo al que aparece esta caída nos sirve para evaluar la movilidad del flujo electrosmótico.

En la tabla 18 se muestran los valores de las movilidades electroforéticas de ambos analitos y la movilidad del flujo electrosmótico calculados a partir de la expresión 7 (pág 54), teniendo en cuenta que la longitud total de la columna ( $L$ ) es de  $92 \text{ cm}$  y que la longitud efectiva de detección UV ( $l$ ) es  $60 \text{ cm}$ .

Tabla 18.- Movilidad del flujo electrosmótico y movilidades electroforéticas de amitrol y urazol bajo condiciones óptimas de separación

	$\mu$ (cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )
<b>Amitrol</b>	1.0 x 10 <sup>-4</sup>
<b>Urazol</b>	-0.7 x 10 <sup>-4</sup>
<b>Flujo electrosmótico</b>	5.1 x 10 <sup>-4</sup>

#### **4.2.8 ESTUDIO DE LOS PARÁMETROS ANALÍTICOS**

Una vez establecidas las condiciones óptimas para la separación y detección amperométrica, se procede a estudiar los parámetros analíticos para la determinación de ambos compuestos con detección dual UV/amperométrica.

##### **A Influencia de las concentraciones de amitrol y urazol**

Para este estudio se preparan diferentes disoluciones acuosas que contienen amitrol y urazol en concentración comprendida entre 0.10 y 1.50 mg L<sup>-1</sup>, registrando a continuación, los electroferogramas correspondientes a la separación con detección dual de estos compuestos, bajo las condiciones óptimas de separación y detección establecidas.

Se realizan seis medidas para cada disolución, empleando posteriormente la media de los resultados obtenidos.

Las figuras 47 y 48 muestran los electroferogramas obtenidos a varias concentraciones de los compuestos, con ambos tipos de detección. La figura 49 muestra la evolución de la altura de pico con la concentración de ambos compuestos en las dos detecciones. La señal obtenida en ambos tipos de detección es proporcional a la concentración, en todo el margen de concentraciones estudiado.

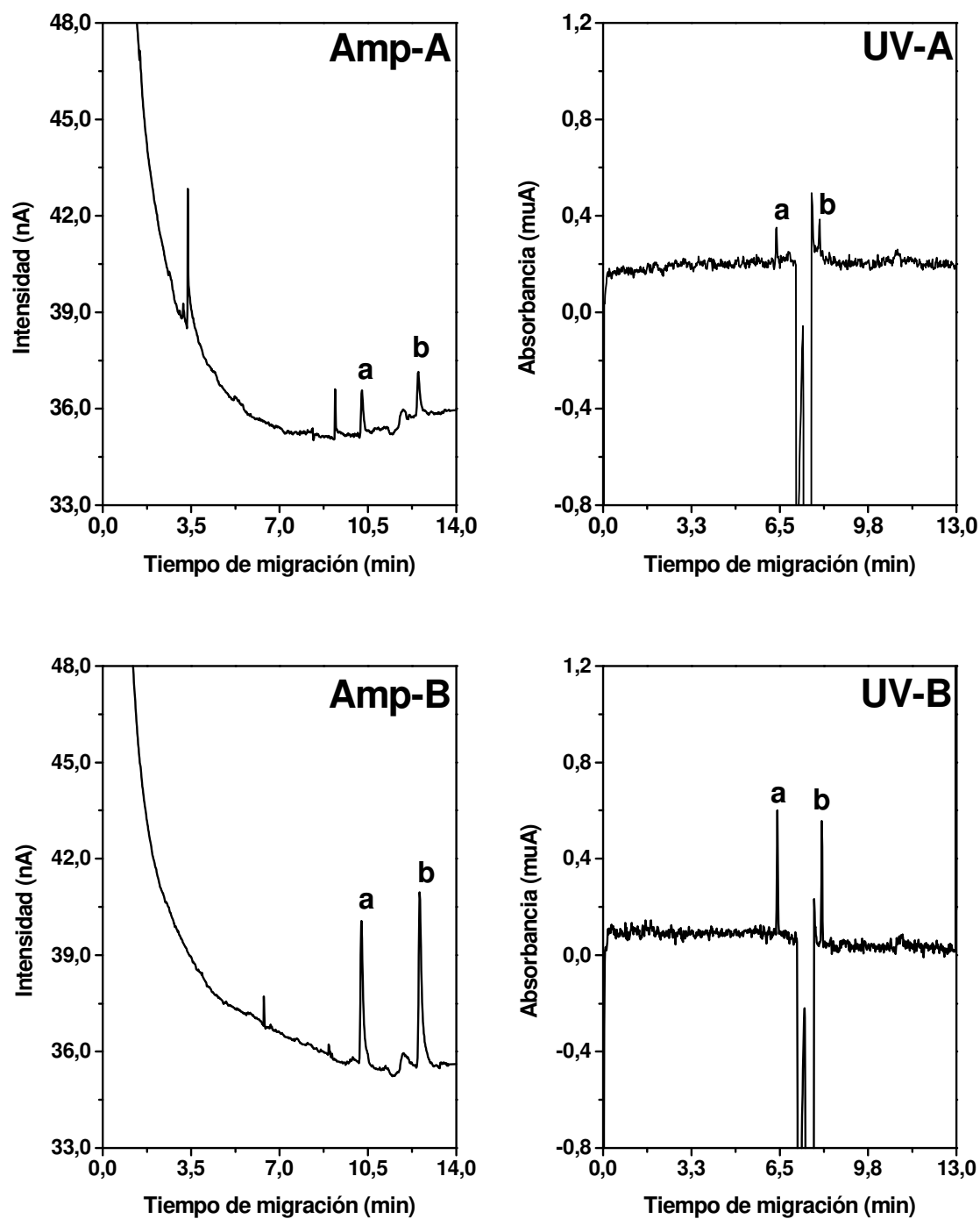


Figura 47.- Electroferogramas correspondientes a la separación de amitrol (a) y urazol (b) con detección dual: amperométrica (Amp) y ultravioleta (UV); a diferentes concentraciones de ambos compuestos: 0.20 mg L<sup>-1</sup> (A) y 0.70 mg L<sup>-1</sup> (B). Condiciones óptimas de separación y detección

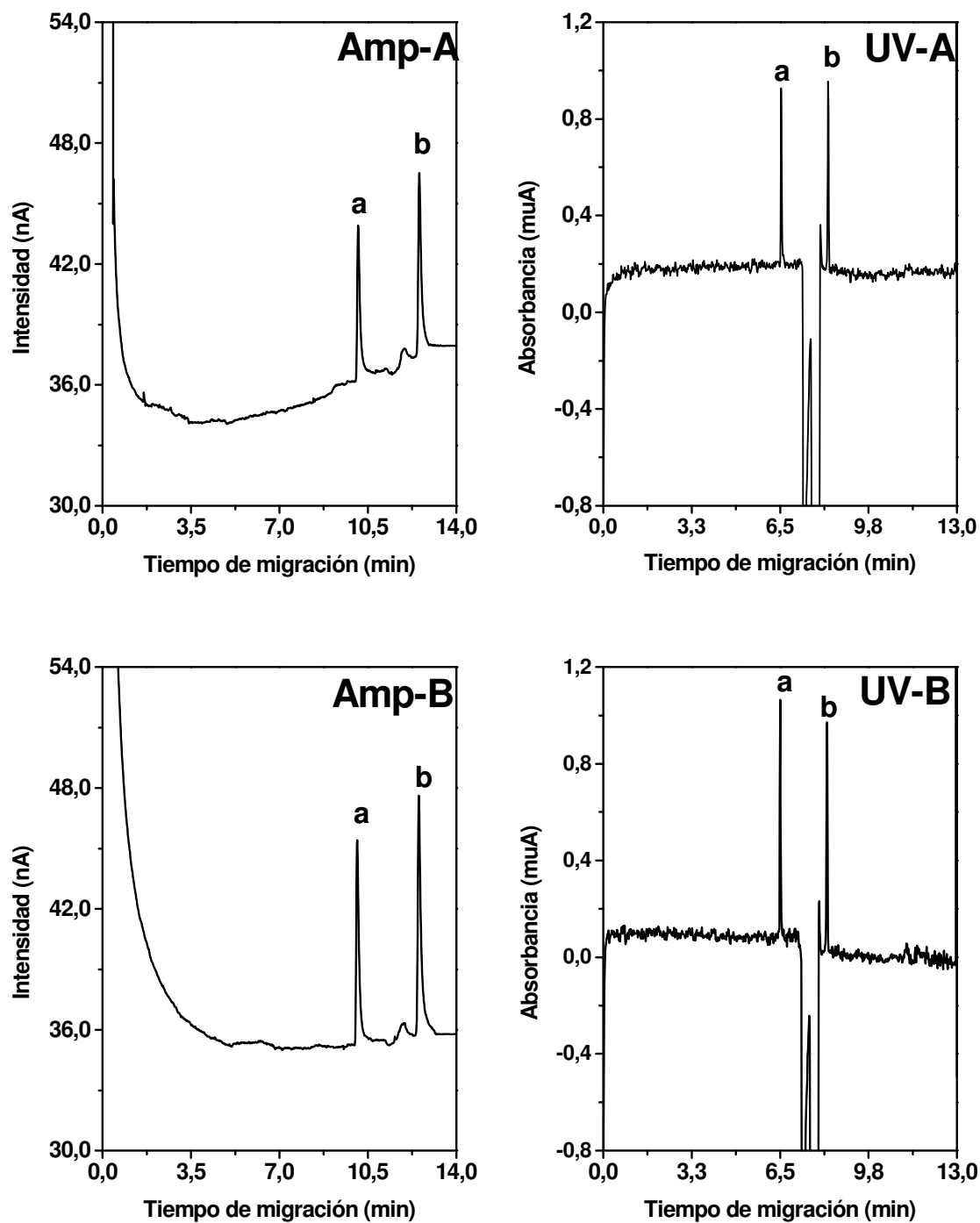


Figura 48- Electroferogramas correspondientes a la separación de amitrol (a) y urazole (b) con detección dual: amperométrica (Amp) y ultravioleta (UV); a diferentes concentraciones de los compuestos: 1.0 mg L<sup>-1</sup> (A) y 1.6 mg L<sup>-1</sup> (B). Condiciones óptimas de separación y detección.



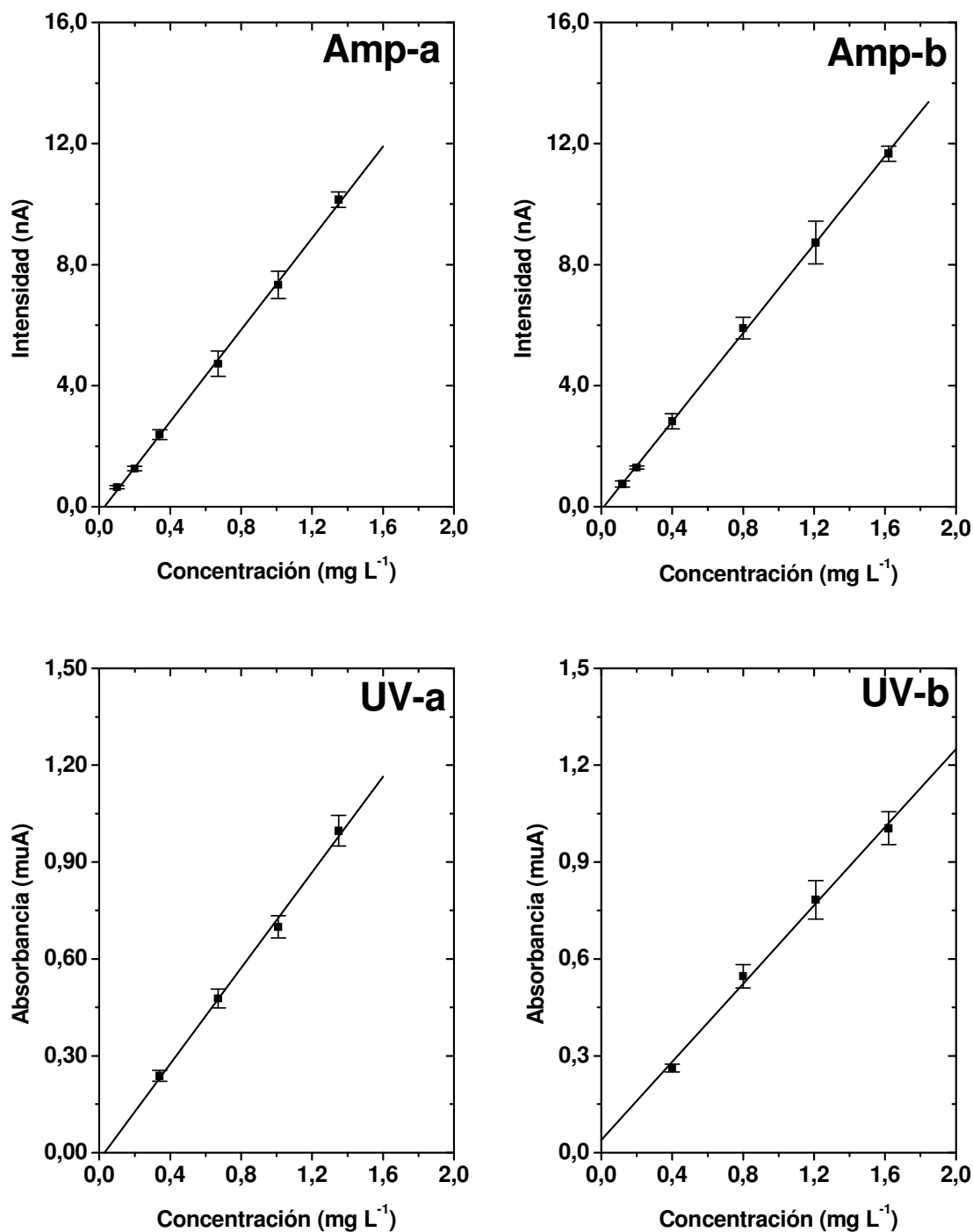


Figura 49.- Evolución de la altura de pico de amitrol (a) e hidroxatrazina (b) con la concentración en detección amperométrica (Amp) y en detección ultravioleta (UV). Se incluye la desviación estándar de cada punto ( $n = 6$ ).

Los parámetros de calibración calculados para amitrol y urazol en ambos tipos de detección se recogen en las tablas 19 y 20, respectivamente. Se incluyen la pendiente ( $S$ ) y ordenada en el origen con sus respectivas desviaciones estándar y los coeficientes de regresión ( $r$ ). Las unidades de la pendiente y ordenada en el caso de la detección amperométrica son [ $\text{nA L mg}^{-1}$ ] y [ $\text{nA}$ ] y en el caso de la detección UV [ $\mu\text{A L mg}^{-1}$ ] y [ $\mu\text{A}$ ] respectivamente.

Tabla 19.- Parámetros de calibración de amitrol

Detección	Pendiente (S)	Ordenada	r	n
Amperométrica	7.6±0.1	-0.22±0.09	0.9996	6
UV	0.74±0.03	-0.02±0.03	0.998	4

Tabla 20.- Parámetros de calibración de urazol

Detección	Pendiente (S)	Ordenada	r	n
Amperométrica	7.30±0.07	-0.10±0.06	0.9998	6
UV	0.60±0.03	0.04±0.03	0.998	4

## B. Cálculo del límite de detección y reproducibilidad

Para la estimación de los límites de detección, al igual que en el apartado 4.1.8.B (pág. 110), se emplea el ruido de fondo ( $N$ ), en la zona de los electroferogramas cercana a la posición de los picos de amitrol y urazol, utilizando la expresión  $25^{83}$ .

Los resultados obtenidos para ambos compuestos en ambos modos de detección, bajo las condiciones óptimas de separación y detección establecidas, se muestran en la tabla 21, junto con la reproducibilidad en la altura de pico y el tiempo de migración para una concentración de  $1.0 \text{ mg L}^{-1}$  de cada compuesto.

Tabla 21.- Límites de detección y reproducibilidad de amitrol y urazol

Compuesto	Detección	Límite de detección ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	DER (%)	
			Altura de pico	Tiempo migración
Amitrol	Amperométrica	45	4.0	1.0
	UV	100	7.5	1.3
Urazol	Amperométrica	85	5.6	1.5
	UV	110	8.0	1.1

En la tabla queda reflejada la mayor sensibilidad de la detección amperométrica frente a la UV para ambos compuestos así como la precisión y robustez del método desarrollado. En ambos casos, en detección amperométrica se obtienen desviaciones estándar relativas inferiores al 5.6 % en altura de pico y al 1.5 % en tiempo de migración. En detección UV, las desviaciones estándar relativas obtenidas son inferiores al 8.0 % en el caso de la altura de pico y al 1.3 % en el caso del tiempo de migración.

#### **4.2.9 DETERMINACIÓN DE AMITROL Y URAZOL EN PRODUCTOS AGROALIMENTARIOS POR DISPERSIÓN DE MATRIZ EN FASE SÓLIDA Y ELECTROFORESIS CAPILAR DE ZONA (MSPD-CZE)**

Como se comentó en la introducción de esta Memoria, el uso necesario de plaguicidas en la agricultura ha dado lugar a la aparición de residuos de estos compuestos en los alimentos, comprometiendo la seguridad alimentaria. Este hecho genera la necesidad de desarrollar nuevas metodologías analíticas cada vez más sensibles, para el seguimiento, detección y determinación de estos residuos en este tipo de matrices.

En las dos últimas décadas el avance tecnológico en el campo instrumental de la Química Analítica ha permitido disponer de detectores cada vez más sensibles y selectivos. Al mismo tiempo también se ha trabajado en el desarrollo de técnicas para el tratamiento de muestras.

En general, las muestras de alimentos tienen una composición química muy compleja y el tratamiento de la muestra es una etapa importante y crítica en el desarrollo de cualquier metodología.

Los métodos clásicos de tratamientos de muestra, aunque eficaces, se caracterizan por su elevado consumo de tiempo, disolventes orgánicos y adsorbentes y por su falta de automatización<sup>100</sup>. Con el fin de intentar superar las principales limitaciones de estos métodos, en los últimos años, se han diseñado y desarrollado nuevas técnicas analíticas como: la dispersión de matriz en fase sólida (MSPD), la extracción con líquidos presurizados (PLE), la extracción con fluidos supercríticos (SFE) y la extracción asistida con microondas (MAE)<sup>101</sup>. Los numerosos estudios realizados<sup>102-106</sup>, han demostrado la viabilidad de estas modernas técnicas de extracción y sus innegables ventajas han hecho que su uso se haya difundido de una manera rápida en distintas áreas de investigación.

La MSPD fue patentada en 1989 por **Barker y col.**<sup>102,103</sup>. Esta técnica, básicamente consiste en la dispersión de la muestra estudiada, que puede ser líquida, viscosa, semisólida o sólida, en la superficie de un adsorbente hasta conseguir una mezcla homogénea. La mezcla, se empaqueta en una columna vacía, en una jeringa o un cartucho de extracción en fase sólida y posteriormente se realiza la elución con un disolvente adecuado.

En lo que se refiere a la elución, hay dos posibilidades:

- Realizar un paso previo de limpieza, eluyendo primeramente los compuestos interferentes, para posteriormente, cambiando el disolvente, eluir los analitos de interés.
- Eluir directamente los analitos de interés

En ocasiones, también se realiza un paso adicional y posterior de limpieza del extracto obtenido utilizando generalmente la SPE, aunque también se ha utilizado la filtración, centrifugación, evaporación y posterior redisolución y la extracción líquido-líquido (LLE).

El tipo de adsorbente y de disolvente a utilizar afecta a la selectividad del procedimiento y dependerá de la polaridad del analito/s así como de la muestra a analizar.

Como adsorbentes se han utilizado silicato magnésico sintético (Florisil)<sup>107</sup>, sílice, material de cromatografía de fase inversa como octasílice (C<sub>8</sub>) y octadecilsílice (C<sub>18</sub>)<sup>108</sup> y de fase normal como cianopropil, aunque este último resulta costoso<sup>109</sup>. Actualmente se está trabajando en nuevos materiales adsorbentes, como sílice acidificada, arenas, polímeros acrílicos y alúmina que en ocasiones aumentan la selectividad del proceso<sup>101</sup>.

Se han empleado como eluyentes disolventes de diferente polaridad como tolueno, diclorometano, agua caliente, hexano, acetato de etilo o mezclas de ellos.

El uso de la MSPD se ha difundido de manera rápida en distintas áreas de la investigación analítica, siendo ya utilizada en el análisis de plaguicidas en alimentos<sup>107,110-116</sup>.

En nuestro trabajo vamos a emplear esta moderna técnica de extracción para la determinación conjunta de amitrol y urazol en muestras de fruta y más concretamente en manzanas.

Ya se ha comentado en la introducción de la Memoria que el amitrol es comercializado en España como herbicida para el cultivo de frutales de pepita, como es el caso de las manzanas, por lo que resulta necesario el desarrollo de metodologías analíticas para la detección y determinación de amitrol a bajos niveles de concentración, en estos frutos. Por otra parte también ha quedado reflejada, la existencia de trabajos en la bibliografía en los cuales se ha identificado el urazol, en cultivos de manzanos que previamente habían sido tratados con amitrol<sup>70</sup>.

Para la realización de los distintos estudios, la manzana se homogeniza por trituración y posteriormente se divide en diferentes porciones de 2.00 g cada una y se congelan para su análisis posterior. Para los diferentes análisis las muestras se descongelan y se pesan porciones de 0.50 g.

Teniendo en cuenta la polaridad del amitrol y su alta solubilidad en agua ( $280 \text{ g L}^{-1}$ ), en un primer procedimiento se decide utilizar como adsorbente, MFE<sup>®</sup>-pak amino y como disolvente agua destilada.

Para la realización de este estudio, se sigue el siguiente procedimiento (figura 50).

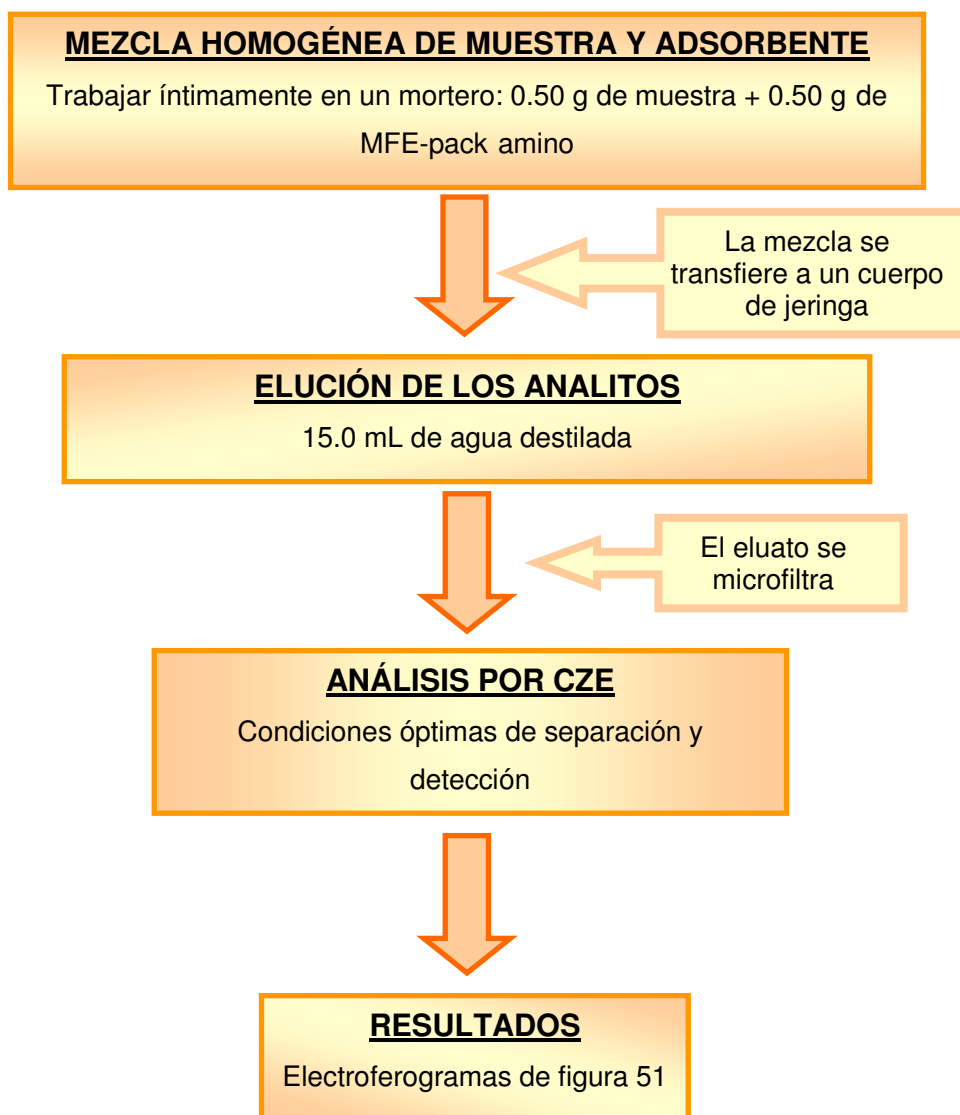


Figura 50.- Procedimiento de análisis de amitrol y urazol en manzanas por MSPD-CZE.

Se colocan en un mortero de vidrio, 0.50 g de manzana y 0.50 g del adsorbente. Después de trabajar íntimamente la mezcla durante 10 minutos con la mano del mortero, se transfiere a un cuerpo de jeringa en el que previamente se ha introducido una fritada. Para eluir los analitos se hacen pasar 15.0 mL de agua destilada. El eluato obtenido se microfiltra y se analiza por CZE con detección dual (UV/Amperométrica), bajo las condiciones óptimas de separación y detección ya establecidas (tabla 18, pág. 143).

Este experimento se realiza tanto para una muestra de manzana sin dopar como para una muestra de manzana previamente dopada con concentraciones de amitrol y urazol de 13 y 18  $\mu\text{g g}^{-1}$ , respectivamente.

En la figura 51 se muestran los electroferogramas obtenidos para el blanco de manzana sin dopar, la manzana dopada y para el blanco de manzana al que se le ha adicionado amitrol y urazol en concentración igual a la que se debería obtener en el eluyente para una extracción con rendimiento del 100%.

Como puede observarse en los electroferogramas de la figura 51, el método descrito es aplicable a la extracción de amitrol y urazol en la muestra de manzana al nivel de concentración estudiado.

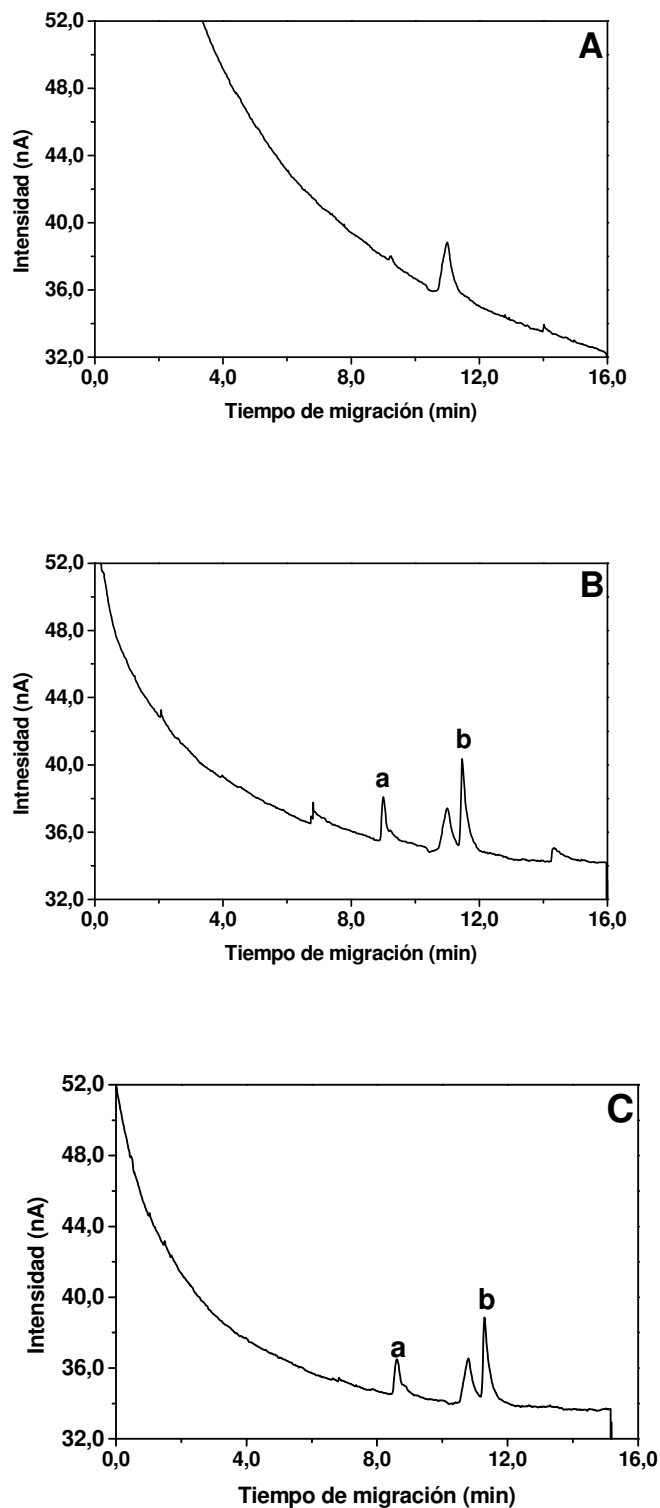
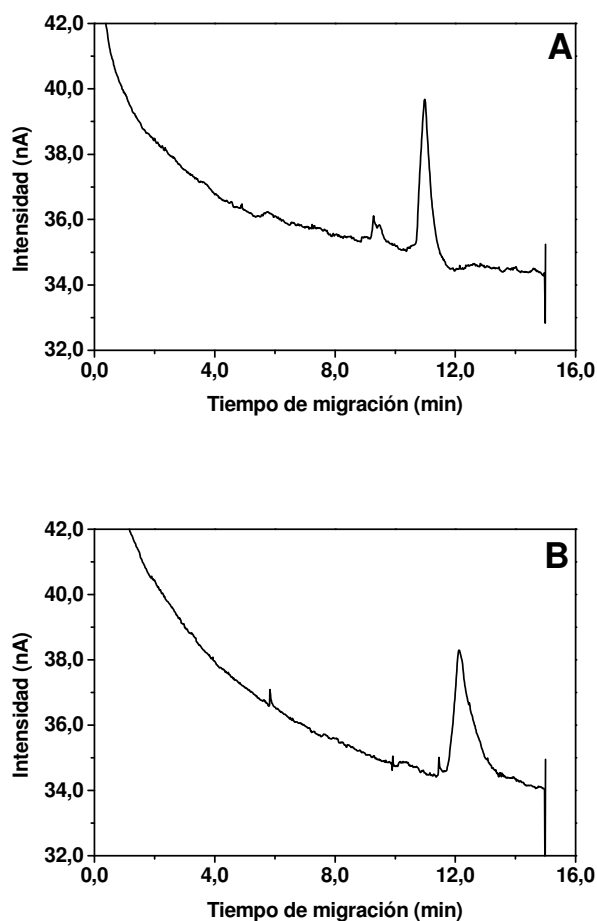


Figura 51.- Electroferogramas del blanco de manzana (A), blanco de manzana dopado (B) y manzana dopada con amitrol (a) y urazol (b) al nivel de 13 y 18  $\mu\text{g g}^{-1}$ , respectivamente (C). Condiciones óptimas de separación y detección.



Con el fin de alcanzar niveles de concentración menores, se procede a disminuir el volumen de disolvente extractante. Se observa que esta disminución del volumen, da lugar a la preconcentración de otros compuestos presentes en la matriz, los cuales interfieren en el análisis, como puede observarse en el electroferograma A de la figura 52. En él, aparecen picos en la zona de migración del amitrol, y el pico ya observado en la figura 51 A, aumenta considerablemente de tamaño e interfiere en la señal analítica de urazol.

Para comprobar si es posible obtener blancos más limpios, a continuación, se procede a emplear metanol como disolvente extractante. En este caso y como puede observarse en el electroferograma B de la figura 52, no se aprecian interferentes en la zona de migración del amitrol pero si en la del urazol.



**Figura 52-. Blanco de manzana obtenido para un volumen de 5.0 mL de disolvente extractante: agua destilada (A), metanol (B). Condiciones óptimas de separación y detección.**

En vista de los resultados obtenidos, se opta por ensayar la inclusión de un paso de limpieza posterior a la extracción, para eliminar los componentes de matriz que interfieren en el análisis. Este paso se realiza empleando la extracción en fase sólida utilizando un cartucho C<sub>18</sub>.

Una vez realizada la elución con 5.0 mL de agua destilada, el extracto obtenido se hace pasar a través del cartucho previamente activado con 5.0 mL de metanol y 5.0 mL de agua destilada. En la figura 53 se muestra resumido el proceso de análisis seguido.

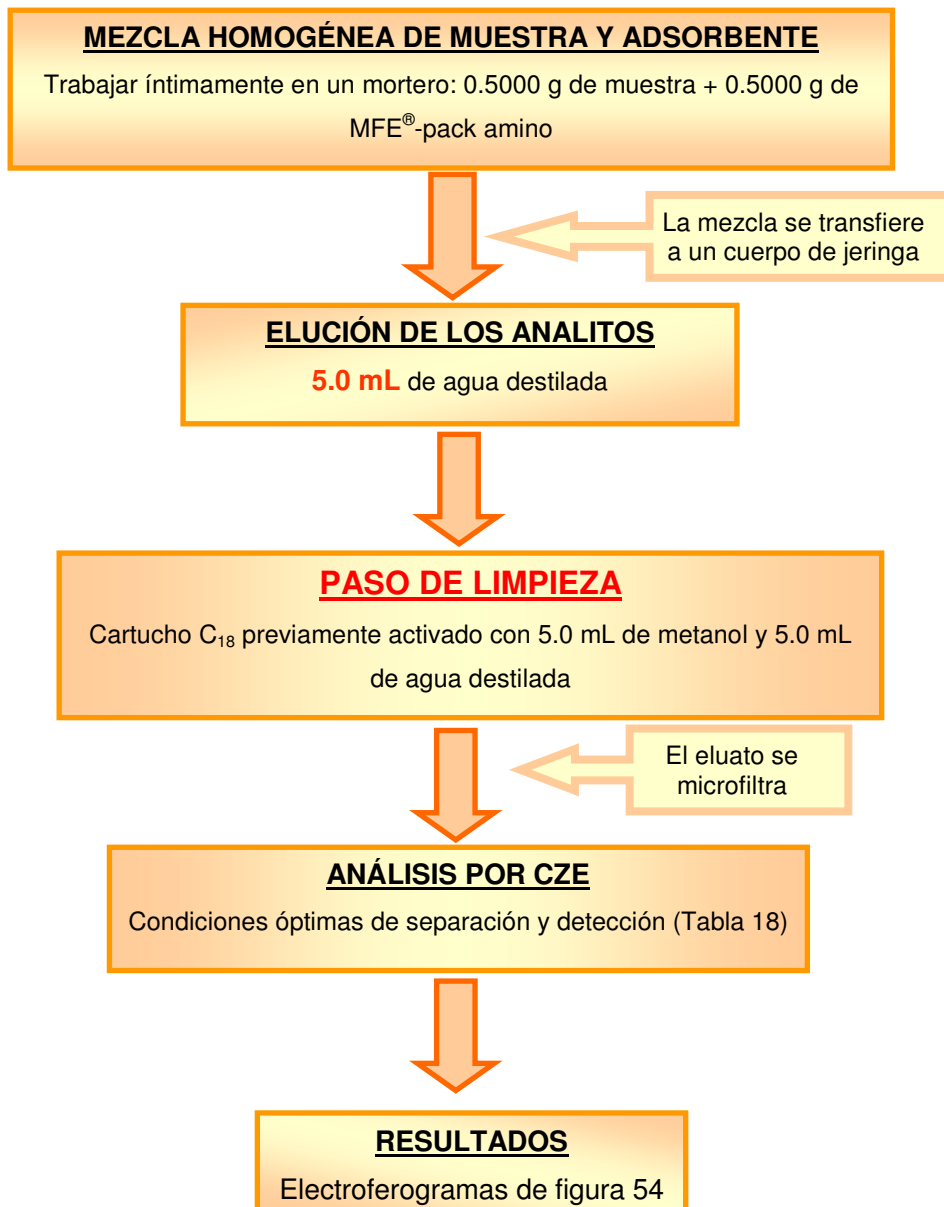


Figura 53.- Procedimiento de análisis de amitrol y urazol por MSPD-CZE.

Se dopan diferentes porciones de manzana con distintas concentraciones de amitrol y urazol, se extraen y analizan bajo las condiciones óptimas establecidas. En la figura 54, se muestran los electroferogramas obtenidos utilizando este procedimiento en una muestra de manzana sin dopar y una muestra de manzana dopada al nivel de 1.6 y 1.7  $\mu\text{g g}^{-1}$  en amitrol y urazol respectivamente.

Como puede observarse, con la incorporación del paso de limpieza previo al análisis por CZE, se consiguen eliminar las interferencias que el blanco de manzana presenta en la zona de migración del amitrol, y la señal observada en el blanco no interfiere en la señal analítica de urazol. En estos electroferogramas también se observa que a este nivel de concentración, ambos compuestos solo pueden ser detectados mediante detección amperométrica ya que no presentan señal en detección UV.

Para la determinación de ambos compuestos se elige el método de adición estándar.

Se tritura la manzana, de la variedad Golden, y se dopa al nivel de 1.6 y 1.7  $\mu\text{g g}^{-1}$  de amitrol y urazol respectivamente, realizando el proceso de extracción indicado anteriormente (figura 53) a diferentes porciones de manzana. Seguidamente, sobre los extractos de manzana obtenidos, se realizan dos adiciones sucesivas de 0.13 y 0.18  $\text{mg L}^{-1}$  de amitrol y urazol respectivamente. Estos extractos, la muestra y las dos adiciones, son analizados bajo condiciones óptimas de separación y detección (tabla 18). A partir de los electroferogramas obtenidos se elaboraran los gráficos de adición estándar para cada uno de los herbicidas, utilizando para ello la altura de pico.

Las ecuaciones de ajuste lineal con sus desviaciones estándar correspondientes, los valores de concentración (C) obtenidos, así como los porcentajes de recuperación (R) calculados para cada muestra se agrupan en las tablas 22 y 33 para amitrol y urazol respectivamente.

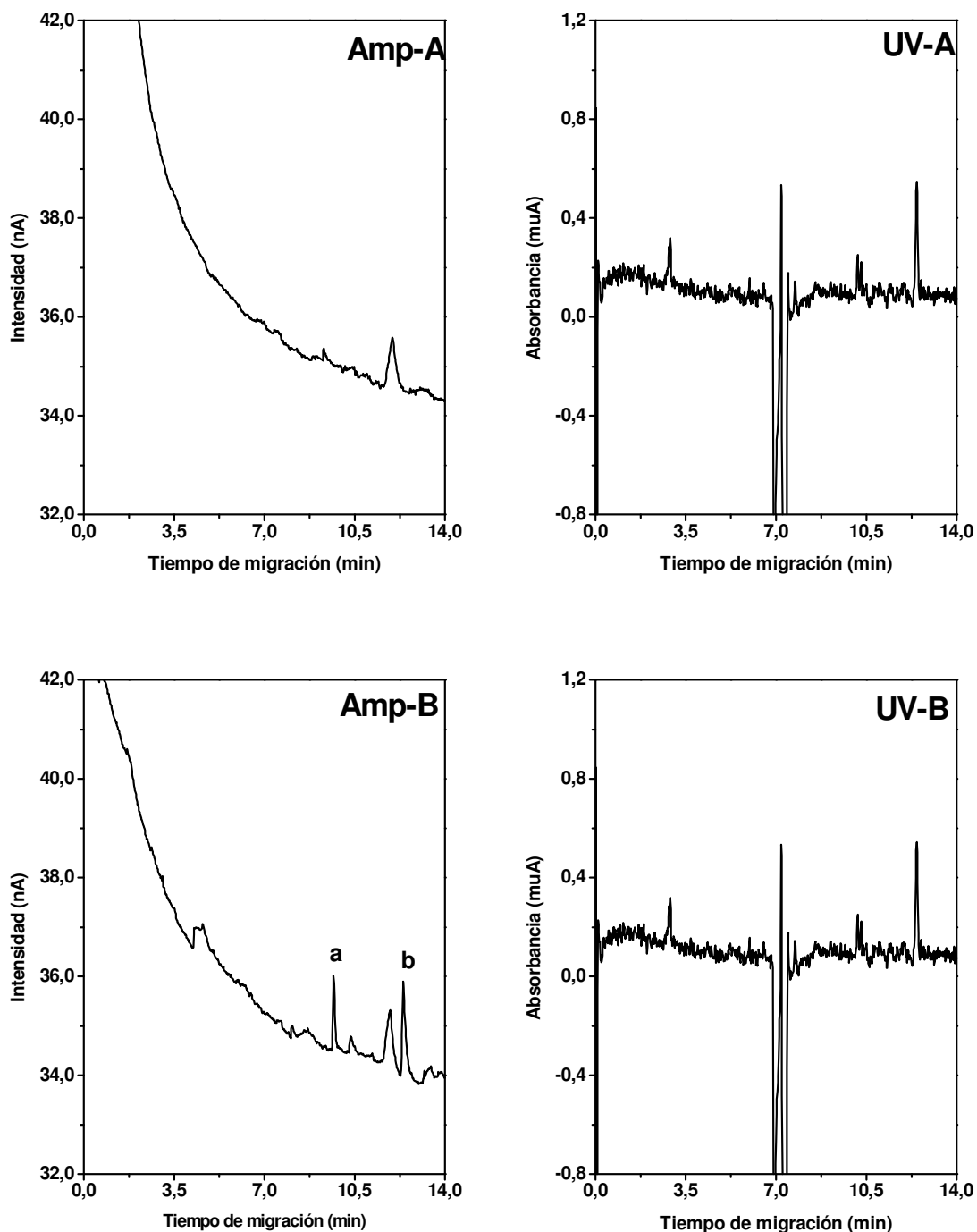


Figura 54.- Electroferogramas de un extracto de manzana sin dopar (A) y de un extracto de manzana dopado al nivel de  $1.6$  y  $1.7 \mu\text{g g}^{-1}$  de amitrol (a) y urazole (b) respectivamente, para ambos tipos de detección: Amperométrica (Amp) y ultravioleta (UV). Condiciones óptimas de separación y detección.

Tabla 22.- Parámetros del ajuste lineal, concentración encontrada y recuperación de amitrol.

Muestra	Pendiente	Ordenada	r	C <sub>encontrada</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	R %
1	7.0±0.5	(1.30±0.10)	0.996	0.19	90
2	7.0±0.2	(1.32±0.04)	0.9995	0.19	90
3	6.3±0.5	(1.20±0.10)	0.995	0.19	90
4	6.5±0.4	(1.12±0.09)	0.997	0.17	81

Pendiente, nA mg L<sup>-1</sup>, ordenada, nA; n=3; Concentración puesta en el extracto: 0.21 mg L<sup>-1</sup>.

Tabla 23.- Parámetros del ajuste lineal, concentración encontrada y recuperación de urazol

Muestra	Pendiente	Ordenada	r	C <sub>encontrada</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	R %
1	6.0±0.8	(1.2±0.2)	0.992	0.20	87
2	6.4±0.2	(1.4±0.1)	0.9990	0.22	97
3	5.3±0.6	(0.8±0.1)	0.995	0.15	65
4	5.9±0.5	(1.1±0.1)	0.999	0.18	78

Pendiente, nA mg L<sup>-1</sup>, ordenada, nA; n=3; Concentración puesta en el extracto: 0.23 mg L<sup>-1</sup>.

Posteriormente se analizan diferentes variedades de manzana (Reineta y Fugi) no encontrándose diferencias significativas entre los blancos ni entre las recuperaciones obtenidas.

## A. Cálculo del límite de detección

Para evaluar los límites de detección, en un primer lugar se calcula el límite de detección de amitrol y urazol en disolución, empleando al igual que en apartados anteriores, el ruido de fondo ( $N$ ) en la zona de los electroferogramas cercana a la posición de los picos, a partir la expresión 25, pág. 110<sup>83</sup>. A continuación, teniendo en cuenta la recuperación del procedimiento de extracción puesto a punto, se calcula el límite de detección en la muestra de manzana.

El límite de detección estimado tanto para amitrol como para urazol es de 0.4 µg g<sup>-1</sup>.

#### **4.2.10 DETERMINACIÓN DE AMITROL Y URAZOL EN AGUA MINERAL COMERCIAL POR ELECTROFORESIS CAPILAR DE ZONA**

El método desarrollado se ha aplicado también para la detección y determinación de amitrol y urazol en muestras de agua mineral embotellada.

A pesar de la mejora obtenida en los límites de detección empleando la detección electroquímica, sigue siendo necesaria una preconcentración de muestra para alcanzar los bajos LMR's impuestos por la Comunidad Europea para aguas potables. Teniendo en cuenta los antecedentes bibliográficos encontrados y los experimentos desarrollados en nuestro laboratorio, la evaporación de la muestra es el modo de preconcentración elegido.

La preconcentración de la muestra de agua se lleva a cabo siguiendo el procedimiento descrito en la figura 55.

Distintas botellas de un agua mineral (BONAQUA) adquiridas en un centro comercial son dopadas a diferentes niveles de concentración de amitrol y urazol y almacenadas a temperatura ambiente durante 3 h<sup>17</sup>. Una vez transcurrido este tiempo, la muestra de 50.0 mL se somete a un proceso de limpieza, haciéndola pasar a través de un cartucho C<sub>18</sub> el cual previamente ha sido activado con 5.0 mL de metanol y 5.0 mL de agua destilada. Posteriormente, la muestra se evapora a sequedad utilizando para ello la ayuda de un rotavapor. El residuo obtenido se reconstituye con 500 µL de agua destilada, se microfiltra y se introduce en el equipo de electroforesis capilar. Al mismo tiempo una muestra de 50.0 mL de agua mineral sin dopar es sometida al mismo procedimiento.

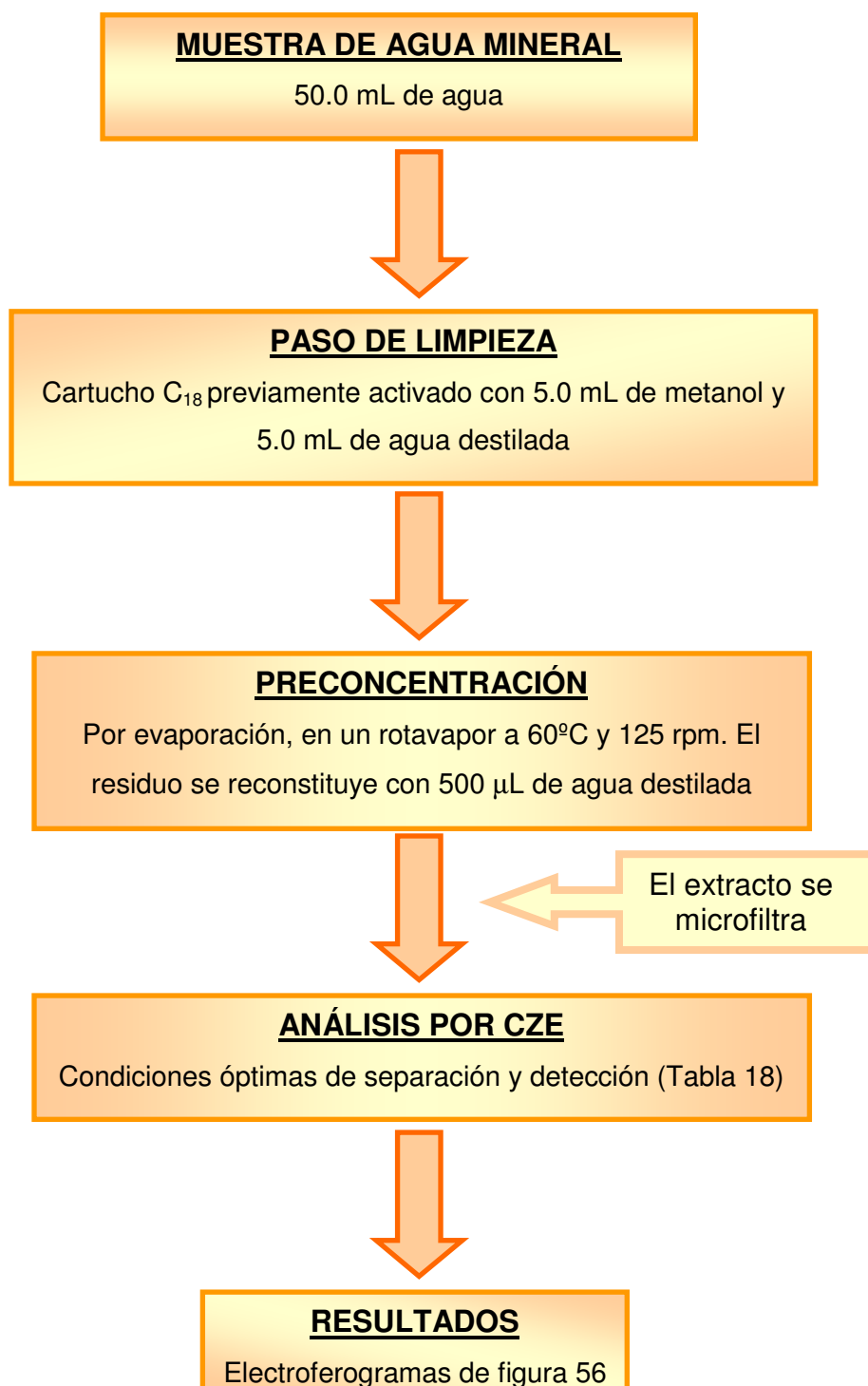


Figura 55.- Procedimiento de preconcentración y análisis de amitrol y urazol en muestras de agua mineral embotellada.

La figura 56 muestra los electroferogramas obtenidos para una muestra de agua sin dopar y para una muestra de agua dopada al nivel de 3.3 µg L<sup>-1</sup> de amitrol y 4.7. µg L<sup>-1</sup> de urazol.

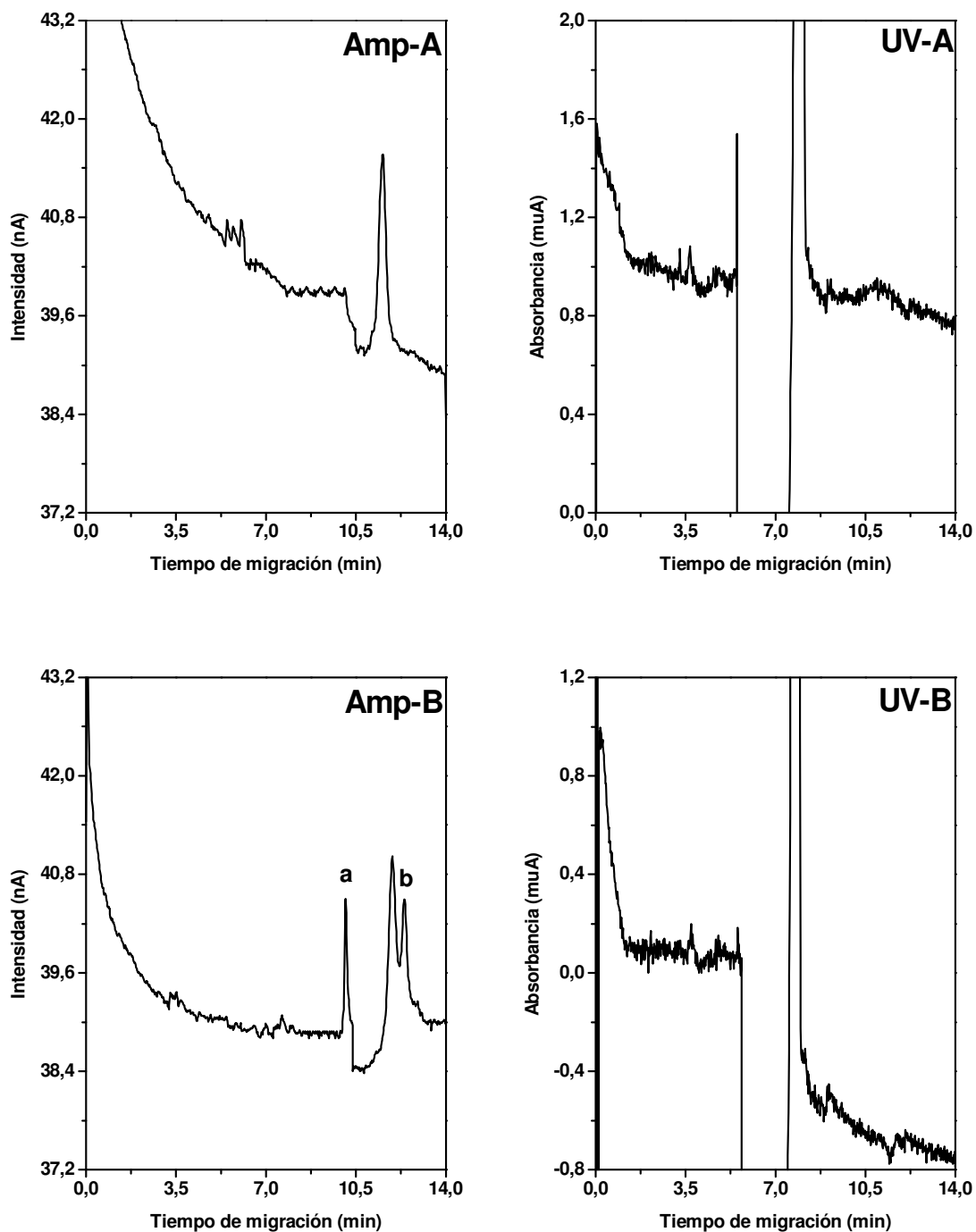


Figura 56.- Electroferogramas de una muestra de agua mineral sin dopar (A) y dopada al nivel de 3.3 y 4.7  $\mu\text{g L}^{-1}$  de amitrol (a) y urazole (b) respectivamente (B), con ambos tipos de detección: amperométrica (Amp) y ultravioleta (UV). Condiciones óptimas de separación y detección.



Como puede apreciarse en los electroferogramas, en el agua mineral sin dopar no se observa ninguna señal al tiempo de migración de ambos compuestos, lo que nos indica que no hay presencia de los compuestos al nivel de concentración detectable con la metodología aplicada. En el caso de la detección amperométrica se observa un único pico muy ancho, debido posiblemente a diversos compuestos neutros presentes en el agua. En el caso de la detección UV, se observa la caída debida a la llegada del bolo de muestra, seguido de un pico muy intenso. A partir de los electroferogramas obtenidos con la muestra de agua dopada se puede comprobar que empleando la detección amperométrica es posible la determinación de ambos compuestos a estos niveles de concentración, cosa que no ocurre empleando la detección UV.

Se elige el método de adición estándar para realizar la determinación cuantitativa de los compuestos en el agua mineral. Para aplicar este método se toman diferentes alícuotas de 50.0 mL del agua mineral dopada y una vez preconcentradas según el procedimiento anteriormente descrito (figura 55), se analizan bajo condiciones óptimas de separación y detección. A continuación, sobre el extracto se realizan adiciones sucesivas de ambos compuestos a diferentes concentraciones, y se analizan de nuevo, bajo condiciones óptimas.

En la figura 57 se muestra la representación gráfica de la altura de pico frente a la concentración adicionada de amitrol y urazol, para una muestra de agua mineral dopada al nivel de 2.4 y 3.3  $\mu\text{g L}^{-1}$  de amitrol y urazol respectivamente.

Los parámetros de calibración calculados para amitrol y urazol en detección electroquímica, se recogen en la tablas 24 y 25 respectivamente, los cuales incluyen la pendiente ( $S$ ) y ordenada con sus respectivas desviaciones estándar y los coeficientes de regresión ( $r$ ), junto con los valores de concentración obtenidos ( $C$ ), así como los porcentajes de recuperación ( $R$ ) calculados para cada muestra. Las unidades de la pendiente y ordenada son [ $\text{nA L mg}^{-1}$ ] y [ $\text{nA}$ ] respectivamente.

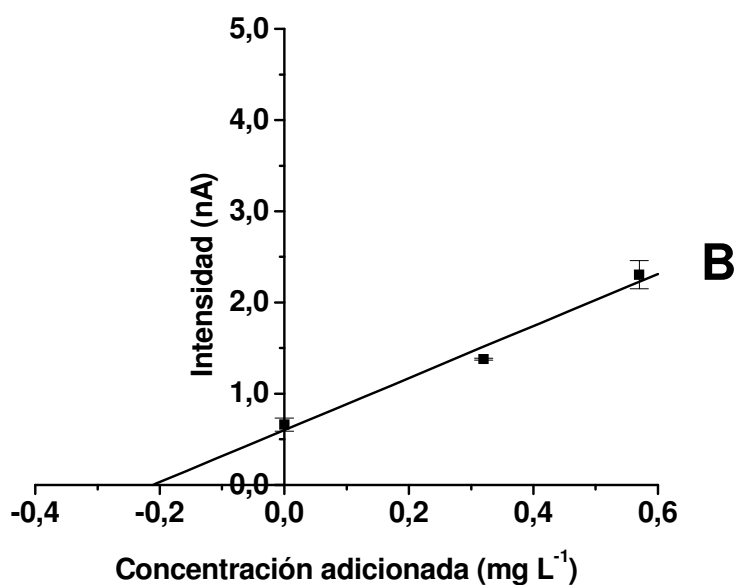
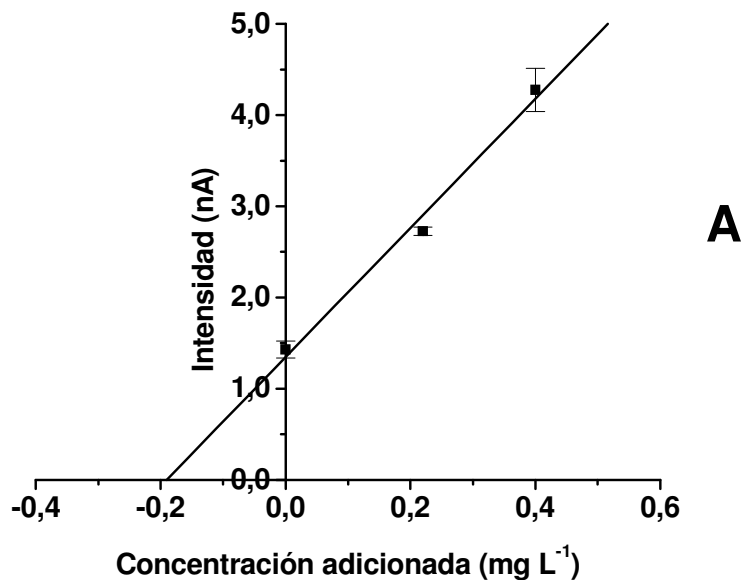


Figura 57. Evolución de la altura de pico con la concentración de amitrol (A) y urazol (B) adicionada. Condiciones óptimas de separación y detección.

Tabla 24.- Parámetros de calibración, y recuperación obtenida en la determinación de amitrol en agua mineral

Muestra	Pendiente	Ordenada	r	C <sub>encontrada</sub> ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	R %
1	7.1 $\pm$ 0.8	1.3 $\pm$ 0.2	0.990	1.8	75
2	7.1 $\pm$ 0.2	1.4 $\pm$ 0.1	0.9998	2.0	83
3	6.5 $\pm$ 0.5	1.4 $\pm$ 0.1	0.990	2.2	92

Tabla 25.- Parámetros de calibración, y recuperación obtenida en la determinación de urazol en agua mineral

Muestra	Pendiente	Ordenada	r	C <sub>encontrada</sub> ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	R %
1	2.9 $\pm$ 0.4	0.6 $\pm$ 0.2	0.990	2.1	64
2	3.8 $\pm$ 0.3	0.98 $\pm$ 0.02	0.9998	2.6	79
3	3.7 $\pm$ 0.1	0.83 $\pm$ 0.04	0.990	2.2	68

Las sensibilidades obtenidas en el caso del amitrol no difieren significativamente de las obtenidas en agua destilada, con recuperación del (83 $\pm$ 9) % (n = 3). En el caso del urazol, la sensibilidad se ve disminuida con respecto al agua destilada, debido a las interferencias de matriz. En este caso, la recuperación obtenida es del (70 $\pm$ 8) % (n = 3).

### A. Cálculo del límite de detección

Los límites de detección se calculan de la misma forma que se han calculado empleando la medida del ruido ( $N$ ) en la zona de los electroferogramas cercana a la posición de los picos de amitrol y urazol, y utilizando la expresión 25<sup>83</sup>.

El caso del amitrol se obtiene un límite de detección de 0.6  $\mu\text{g L}^{-1}$  y en el caso del urazol de 1.0  $\mu\text{g L}^{-1}$ .



## **5. ESTUDIOS ELECTROANALÍTICOS DE AMITROL**



Tras un estudio bibliográfico extenso, solamente pueden encontrarse trabajos relativos a la detección de amitrol de forma amperométrica utilizando en muchos casos como electrodo de trabajo un electrodo de *"glassy carbon"*<sup>43,46,49</sup>. En ningún caso, y hasta la fecha de preparación de la Memoria se han publicado estudios sobre el comportamiento electroquímico del herbicida amitrol sobre este electrodo.

En el presente capítulo se examina el comportamiento electroquímico de amitrol sobre un electrodo de *"glassy carbon"*, con el fin de conocer sus propiedades electroquímicas más significativas y evaluar los parámetros cinéticos del proceso de oxidación.

Para la realización del estudio, se registran medidas en régimen no estacionario y en régimen estacionario empleando en este caso un electrodo rotatorio, dado que con éste, el régimen estacionario se alcanza más rápidamente.

Además, se desarrolla una metodología analítica para la determinación de amitrol por voltamperometría de barrido lineal utilizando el electrodo de *"glassy carbon"*, para posteriormente aplicarla en la determinación de amitrol en muestras de agua de río.

Por otra parte, con el objetivo de desarrollar nuevos sensores electroquímicos con base de carbono para su uso en la determinación electroquímica de amitrol, se ha estudiado la señal analítica del herbicida sobre electrodos de pasta de nanotubos de carbono (CNTPE), debido a las propiedades electrocatalíticas de este tipo de materiales<sup>118</sup>.

A partir de estos estudios se ha comprobado la adsorción de amitrol sobre los electrodos de pasta de nanotubos de carbono preparados con nanotubos de carbono largos. Se ha desarrollado una metodología analítica para la determinación de amitrol por voltamperometría de adsorción-redisolución empleando este tipo de electrodos y se ha aplicado posteriormente a la determinación del herbicida en muestras de agua de río y de consumo.





## **5.1 ESTUDIO ELECTROANALÍTICO DE AMITROL EN ELECTRODO DE “GLASSY CARBON”**



### 5.1.1 ENSAYOS PREVIOS

#### A. Cálculo del área efectiva de los electrodos de trabajo

El conocimiento del área efectiva de los electrodos de trabajo empleados en los estudios electroquímicos, resulta en algunos casos, imprescindible para la estimación de los parámetros cinéticos y la evaluación del número de electrones involucrados en el proceso electroquímico estudiado, así como para el cálculo del coeficiente de difusión de las sustancias objeto de estudio.

Antes de iniciar los estudios electroquímicos de amitrol, se evalúa el área efectiva de los dos electrodos de trabajo que se utilizan, ambos de "glassy carbon":

- Electrodo empleado en estudios en régimen no estacionario.
- Electrodo empleado en estudios en régimen estacionario.

En este estudio se emplean dos técnicas electroanalíticas diferentes: la cronoamperometría y la voltamperometría en disco rotatorio.

*La cronoamperometría es una técnica usada generalmente para determinar el área del electrodo, el coeficiente de difusión de una especie o el número de electrones intercambiados en un proceso redox. La señal registrada es la intensidad de corriente frente al tiempo. La variación de la intensidad con el tiempo está descrita para un electrodo plano por la ecuación de Cottrell<sup>19</sup>:*

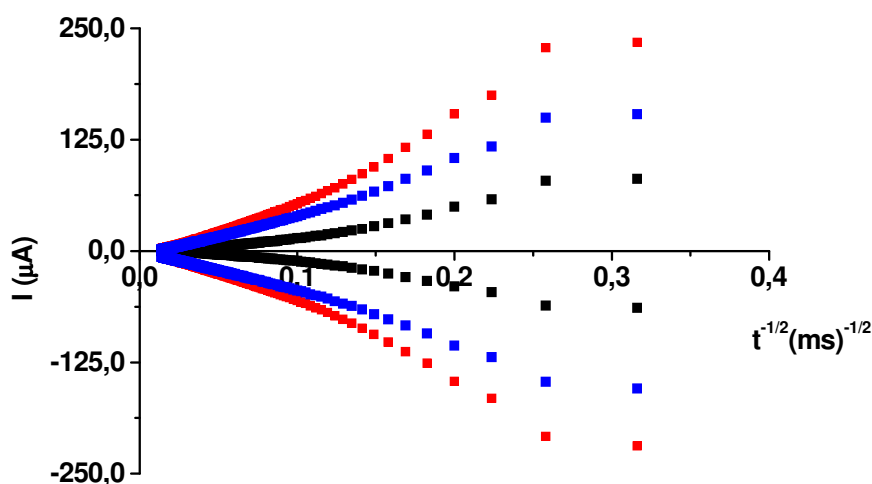
$$i = \frac{nFAD^{1/2}C}{\pi^{1/2}t^{1/2}} \quad (26)$$

*donde  $i$  [A] es la intensidad de corriente,  $n$  [eq mol<sup>-1</sup>] el número de electrones intercambiados por molécula,  $F$  [96500 C eq<sup>-1</sup>] la constante de Faraday,  $A$  [cm<sup>2</sup>] el área del electrodo,  $C$  [mol cm<sup>-3</sup>] la concentración de la especie electroactiva,  $D$  [cm<sup>2</sup>s<sup>-1</sup>] el coeficiente de difusión y  $t$  [s] el tiempo.*

*El área del electrodo se puede conocer a partir de la pendiente de la representación gráfica de la variación de intensidad frente a la inversa de la raíz cuadrada del tiempo, en el intervalo de tiempo óptimo.*

Para este estudio se utilizan disoluciones de hexacianoferrato (III) de potasio en concentración  $1.50 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  en KCl  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ . El coeficiente de difusión del hexacianoferrato (III) de potasio en este medio es  $(0.763 \pm 0.005) \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  a  $25 \text{ }^\circ\text{C}^{120}$  y el número de electrones intercambiados 1.

En la figura 58, se muestra uno de los registros de la variación de la intensidad de corriente en función de la inversa de la raíz cuadrada del tiempo, obtenido por cronoamperometría con el electrodo estático, utilizando el electrodo que va a ser usado en los estudios de régimen estacionario.



**Figura 58.-** Representación de la intensidad de corriente frente a la inversa de la raíz cuadrada del tiempo para: una disolución  $1.50 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  en  $\text{KCl } 0.10 \text{ mol L}^{-1}$  (■), una disolución de  $\text{KCl } 0.10 \text{ mol L}^{-1}$  (■) y la diferencia entre ambas (■). Potencial inicial 700 mV, potencial final 0 mV, tiempo del impulso 5.0 s.

El valor del área efectiva obtenido para este electrodo es de  $0.058 \pm 0.002 \text{ cm}^2$ , ( $n=3$ ). De la misma forma, se obtiene también el área efectiva del electrodo empleado en los estudios en régimen no estacionario. El valor obtenido de ésta es  $0.056 \pm 0.003 \text{ cm}^2$ , ( $n=3$ ).

Se evalúa también el área efectiva del electrodo utilizado en los estudios en régimen estacionario, por voltamperometría de barrido lineal con electrodo rotatorio.

*Por voltamperometría en electrodo rotatorio, el área efectiva del electrodo se evalúa empleando la ecuación de Levich<sup>119</sup>:*

$$I_l = 0.620nFAD^{2/3} w^{1/2} \nu^{-1/6} C \quad (27)$$

donde  $I_l$  [A] es la corriente límite,  $w$  [rad s<sup>-1</sup>] la velocidad de rotación,  $\nu$  [cm<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>] es la viscosidad cinemática de la disolución.

El área del electrodo se calcula a través de la representación gráfica de la intensidad límite ( $I_l$ ) frente a la raíz cuadrada de la velocidad de rotación ( $w^{1/2}$ ), conociendo el resto de parámetros de la ecuación.

Para ello se utilizan disoluciones de hexacianoferrato (III) de potasio en concentración  $5.10 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> en KCl 0.10 mol L<sup>-1</sup>. Los barridos se realizan a partir de un potencial inicial de 700 mV hasta un potencial final de -300 mV a una velocidad de barrido de 10 mV s<sup>-1</sup>, para diferentes frecuencias de rotación comprendidas entre 500 y 6000 rpm.

En la figura 59 se muestra la representación gráfica de la evolución de la intensidad límite frente a la velocidad de rotación.

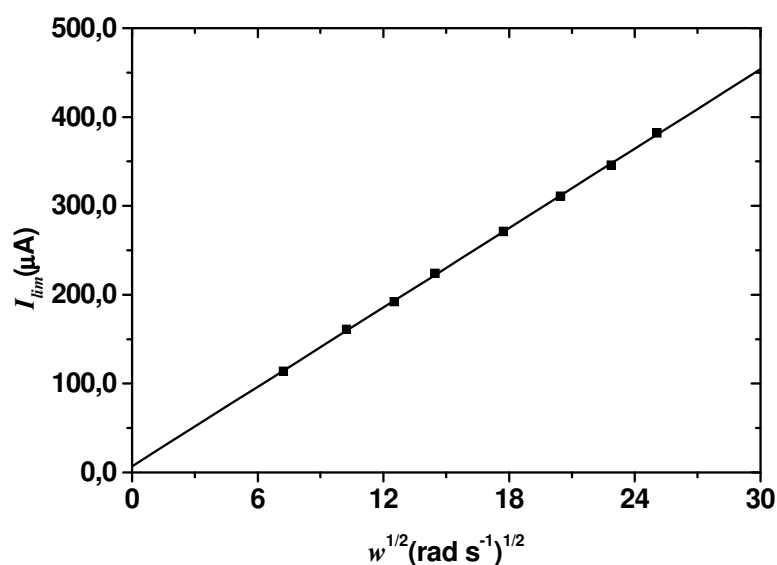


Figura 59.- Evolución de la intensidad límite frente a la raíz cuadrada de la velocidad de rotación para una disolución de K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>  $5.10 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> en KCl 0.10 mol L<sup>-1</sup>. Velocidad de barrido 10 mV s<sup>-1</sup>.

La intensidad límite obtenida, muestra una variación lineal con la raíz cuadrada de la velocidad de rotación con pendiente  $14.9 \pm 0.1$  µA s rad<sup>-1</sup>.

A partir del valor de la pendiente de esta representación gráfica se obtiene un valor para la superficie del electrodo de  $0.058 \pm 0.001 \text{ cm}^2$  ( $n=3$ ). Valor que coincide con el obtenido anteriormente utilizando la cronoamperometría.

Resumiendo, el área efectiva obtenida para los dos electrodos es:

- Electrodo empleado en régimen no estacionario:  $0.056 \pm 0.003 \text{ cm}^2$ .
- Electrodo empleado en régimen estacionario:  $0.058 \pm 0.002 \text{ cm}^2$ .

### 5.1.2 ESTUDIOS EN ELECTRODO ESTÁTICO

La voltamperometría cíclica pertenece a un grupo de técnicas electroanalíticas en las cuales la información sobre el analito se obtiene a partir de medidas de la intensidad de corriente en función del potencial aplicado.

En esta técnica, la señal de intensidad en el electrodo de trabajo está provocada por una señal de excitación triangular como la que se muestra en la figura 60, en la que el potencial se varía linealmente desde un valor inicial  $E_i$  hasta alcanzar un valor  $E_\lambda$ , denominado potencial de inversión, al cual se invierte la dirección del barrido hasta alcanzar un potencial final  $E_f$ . El barrido de potencial frecuentemente se termina al final del primer ciclo o puede continuarse realizando ciclos sucesivos.

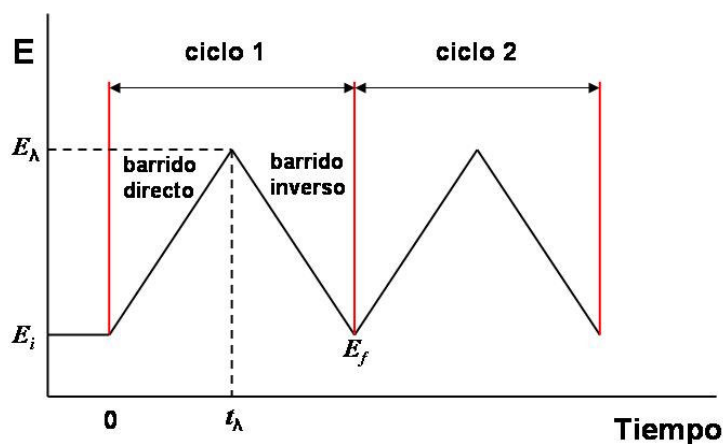


Figura 60.- Señal de excitación potencial-tiempo triangular<sup>121</sup>.

Para la obtención de un barrido cíclico, se mide la corriente que pasa por el electrodo de trabajo en una disolución sin agitar, durante el barrido de potencial.

Esta técnica electroanalítica es probablemente la más eficiente y versátil para el estudio mecanístico de las reacciones electrónicas y generalmente suele emplearse en el primer experimento que se lleva a cabo en un estudio electroquímico<sup>119,121</sup>.

## **A. Influencia del medio de medida**

### **A.1 Influencia del pH**

*La mayor parte de los procesos electródicos de compuestos orgánicos dependen del pH, debido a que generalmente en estos procesos están involucrados protones, bien porque participen en un equilibrio ácido-base o hidrólisis o bien porque intervengan en la reacción electroquímica. Es por ello que resulta imprescindible empezar por el estudio de la influencia del pH en el proceso electroquímico.*

Se estudia la influencia del pH del medio sobre la respuesta del amitrol, empleando disoluciones del herbicida en concentración  $9.40 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  en tampón Britton-Robinson  $0.040 \text{ mol L}^{-1}$ , para un margen de pH comprendido entre 2.0 y 12.0.

Se registran los voltamperogramas cíclicos en los diferentes medios a una velocidad de barrido de  $50 \text{ mV s}^{-1}$ . El potencial inicial de barrido se fija en función del pH de estudio (entre -100 y -500 mV) y el potencial final de barrido en todos los casos a 1500 mV.

Las figuras 61 y 62 muestran algunos de los registros obtenidos a los diferentes pH estudiados, tanto de la disolución de amitrol como del electrolito soporte.

En estos voltamperogramas se observa, que en el primer barrido anódico, el amitrol presenta una única onda de oxidación (Ox1) para valores de pH inferiores a 8.5. Este sistema es irreversible dado que no presenta onda de reducción en el barrido catódico de vuelta. A valores de pH superiores a 8.5 el amitrol presenta dos ondas de oxidación (Ox1 y Ox2), también irreversibles. Se observa además un par redox en todo el margen de pH estudiado, denotado en la figura 61 como Red3/Ox3.

Como puede observarse en la figura 63 A, la intensidad de pico de la señal anódica (Ox1) permanece prácticamente constante hasta un valor pH de 6.0 disminuyendo a valores superiores a éste. A pH superiores a 8.5, no es posible medir su intensidad como consecuencia de la aparición de la segunda onda de oxidación (Ox2). La intensidad de ésta última aumenta con el aumento del pH.



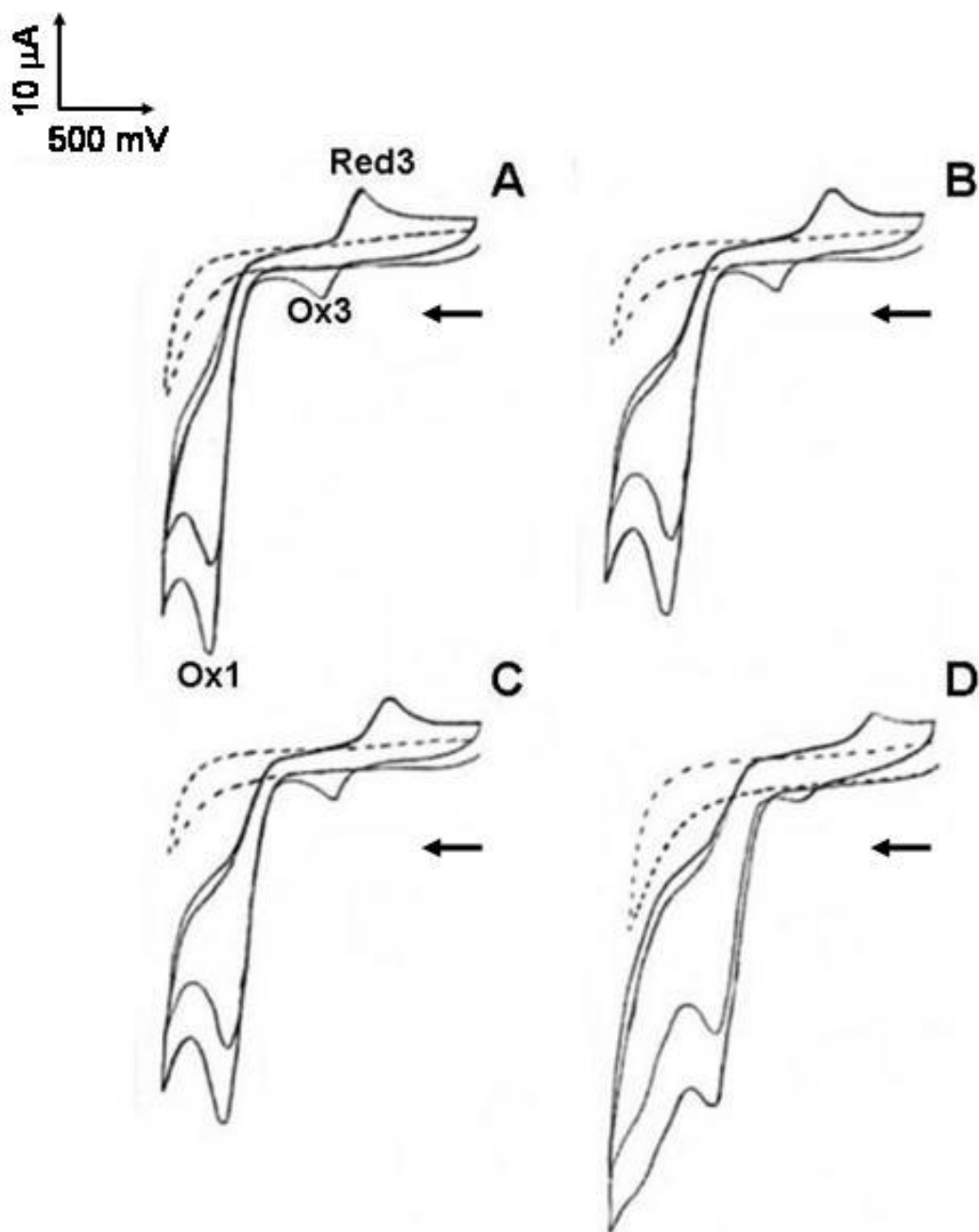


Figura 61.- Voltamperogramas cíclicos de amitrol  $9.40 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  en medio tampón Britton-Robinson  $0.040 \text{ mol L}^{-1}$  ajustado a diferentes pH: 2.0 (A), 3.0 (B), 5.0 (C) y 7.0 (D). Potencial inicial de barrido: -100 mV en A, B y C, y -200 mV en D; potencial final de barrido: 1500 mV; velocidad de barrido:  $50 \text{ mV sg}^{-1}$ .

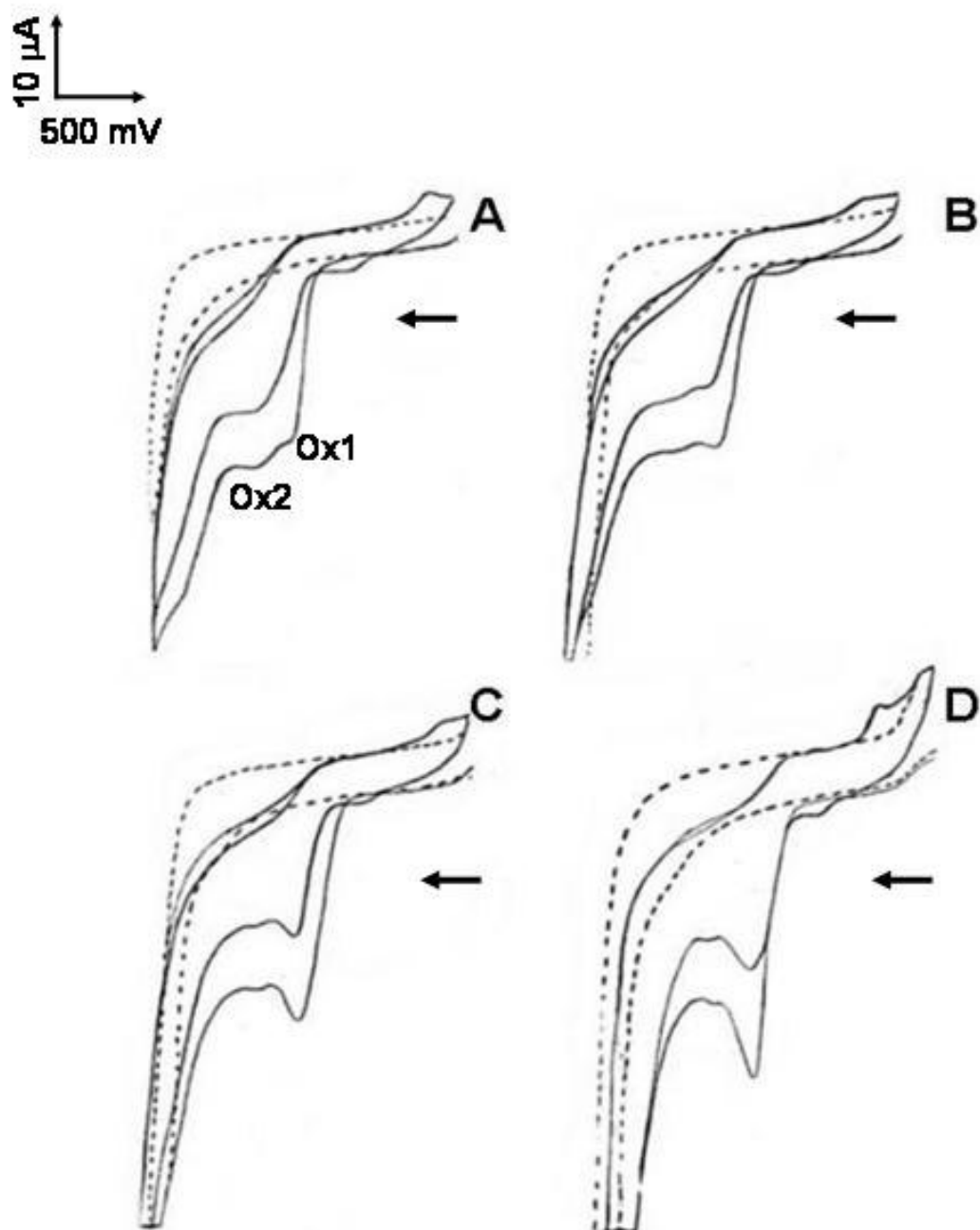


Figura 62.- Voltamperogramas cíclicos de amitrol  $9.40 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  en medio tampón Britton-Robinson  $0.040 \text{ mol L}^{-1}$  ajustado a diferentes pH: 9.0 (A), 10.0 (B), 11.0 (C) y 12.0 (D). Potencial inicial de barrido: -200 mV en A, -300 mV en B y C y -500 mV en D; potencial final de barrido: 1500 mV; velocidad de barrido:  $50 \text{ mV sg}^{-1}$ .

El potencial de pico de la primera onda anódica (Ox1) se desplaza hacia valores menores con el aumento de pH, hasta un pH de 6.0 y para valores de pH superiores a 9.0, siendo estas variaciones lineales con pendientes  $-104$  y  $-45$   $\text{mV pH}^{-1}$ , permaneciendo constante a valores de pH entre 6.0 y 9.0, tal como se muestra en la figura 63 B. En el caso de la segunda onda (Ox2), el valor del potencial de pico disminuye linealmente con el pH con pendiente  $-49$   $\text{mV pH}^{-1}$ .

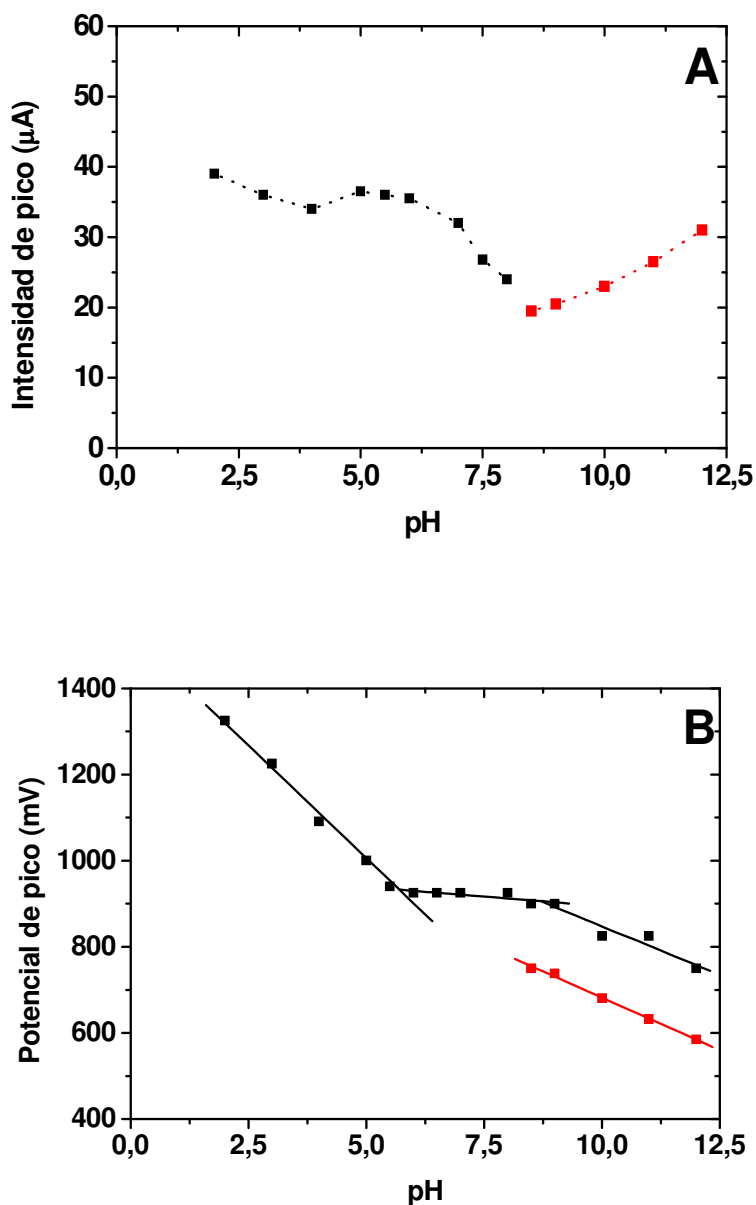


Figura 63.- Evolución del potencial de pico ( $E_p$ ) e intensidad de pico ( $I_p$ ) de Ox1 (■) y Ox2 (■) con el pH. Condiciones igual que figura 61.

Para el par redox Red3/Ox3, se estima el valor del potencial formal ( $E_0$ ) como la media del potencial de los picos anódico y catódico. El valor de  $E_0$  muestra variación lineal con el pH de acuerdo con la ecuación:

$$E_0 = (0.71 \pm 0.01) - (0.058 \pm 0.002) \text{ pH} \quad (n=11, r=0.995)$$

A la vista de los resultados obtenidos, se elige pH 2.0, como pH de medida para continuar con el estudio de la oxidación de amitrol sobre un electrodo de "glassy carbon", ya que es donde se obtiene una mayor intensidad para el pico Ox1.

### A. 2 Influencia de la naturaleza del medio

Para la realización de este estudio, se registran los voltamperogramas cíclicos, empleando disoluciones del herbicida en concentración  $9.40 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  en diferentes disoluciones ácidas de pH 2.0: ácido sulfúrico  $0.005 \text{ mol L}^{-1}$ , ácido perclórico  $0.01 \text{ mol L}^{-1}$  y ácido fosfórico  $0.026 \text{ mol L}^{-1}$ . El potencial inicial de barrido se fija en  $-300 \text{ mV}$  y el potencial final en  $1500 \text{ mV}$ , siendo la velocidad de barrido  $50 \text{ mV s}^{-1}$ .

En la tabla 26 se muestran los valores del potencial de pico y la intensidad de pico de las tres ondas (Ox1, Ox3 y Red3) aparecidas en los registros obtenidos.

Tabla 26.- Potencial e intensidad de pico de Ox1, Ox3 y Red3 en diferentes medios

	Ox1		Ox3		Red3	
	$E_p \text{ (mV)}$	$I_p \text{ (}\mu\text{A)}$	$E_p \text{ (mV)}$	$I_p \text{ (}\mu\text{A)}$	$E_p \text{ (mV)}$	$I_p \text{ (}\mu\text{A)}$
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.005 M</b>	1232	34.7	639	3.5	530	7.0
<b>HClO<sub>4</sub> 0.01 M</b>	1265	30.0	680	2.0	490	4.2
<b>H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0.026 M</b>	1240	36.5	650	4.5	550	7.0

Resultados obtenidos de la media de tres voltamperogramas.

Como se observa en la tabla 26, no existen grandes diferencias entre los resultados obtenidos en los diferentes medios estudiados. Se elige ácido fosfórico  $0.026 \text{ mol L}^{-1}$  como medio de medida para posteriores estudios ya que en este medio se obtiene una ligera mayor sensibilidad.

## **B. Influencia del potencial inicial y sentido del barrido**

Se realiza un estudio de la influencia del potencial inicial de barrido en la señal anódica (Ox1) y el par redox (Red3/Ox3). Para ello se registran diferentes voltamperogramas cíclicos, siendo la dirección del primer barrido anódica, variando el potencial inicial de barrido entre 0 mV y 1300 mV, para una disolución de amitrol en concentración  $9.80 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  en medio ácido fosfórico  $0.026 \text{ mol L}^{-1}$ .

En la figura 64 se muestran algunos de los voltamperogramas obtenidos.

Puede observarse que ni la señal anódica de amitrol (Ox1) ni las del par redox (Red3/Ox3) se ven influenciadas por el potencial inicial de barrido anódico.

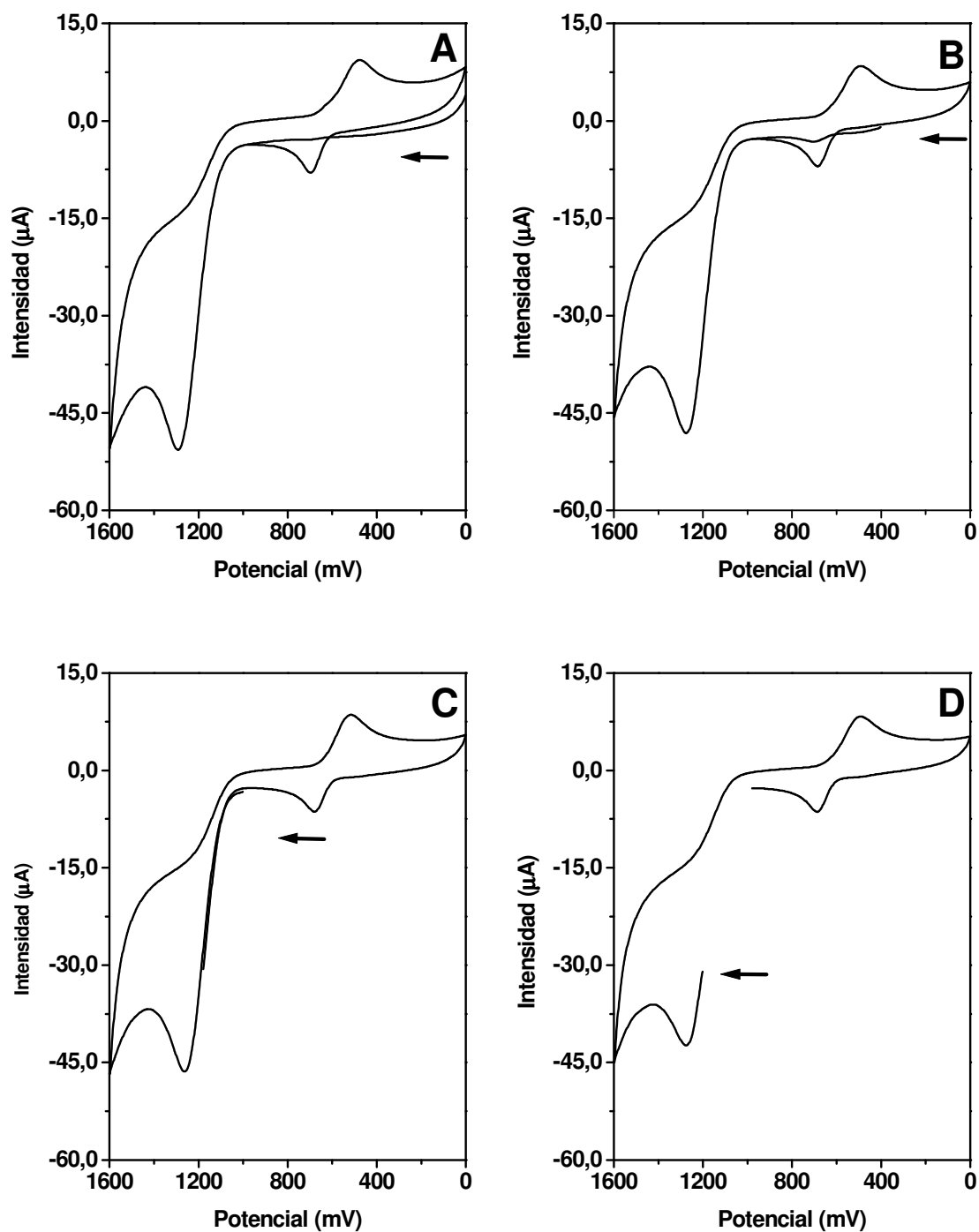


Figura 64.- Voltamperogramas cíclicos obtenidos aplicando diferentes potenciales iniciales de barrido: 0 (A), 400 (B), 1000 (C) y 1200 mV (D). Concentración de amitrol:  $9.80 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  en ácido fosfórico  $0.026 \text{ mol L}^{-1}$ . Velocidad de barrido:  $50 \text{ mV s}^{-1}$ . Dirección del primer barrido: anódica.

A continuación, se realiza un estudio del potencial inicial de reducción. En este estudio se comienza registrando en primer lugar el barrido en la dirección catódica. Se realizan diferentes voltamperogramas cíclicos variando el potencial inicial entre 1000 y 1500 mV, sobre una disolución de amitrol  $9.80 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  en ácido fosfórico  $0.026 \text{ mol L}^{-1}$  a una velocidad de barrido de  $50 \text{ mV s}^{-1}$ . Se trata de estudiar la influencia del potencial inicial de reducción sobre la formación del par redox (Red3/Ox3). La figura 65 muestra alguno de los voltamperogramas cíclicos obtenidos.

Se puede concluir que el potencial inicial de reducción influye en la formación del par redox. Cuando se aplica un potencial inicial de 1000 mV, éste no es lo suficientemente alto como para oxidar al amitrol en la superficie del electrodo, y por ello no se observa la señal del par redox en el registro obtenido (figura 65A). Cuando el potencial inicial de barrido si es lo suficientemente alto como para que se produzca la oxidación de amitrol, comienzan a observarse las señales correspondientes al par redox (figura 65 (B, C y D)).

Los resultados obtenidos hasta el momento indican que el amitrol en las condiciones elegidas en este estudio (ácido fosfórico  $0.026 \text{ mol L}^{-1}$ ), presenta una onda de oxidación (Ox1), tras la cual se da una reacción química que genera producto/s electroactivo/s responsables del par redox posterior.

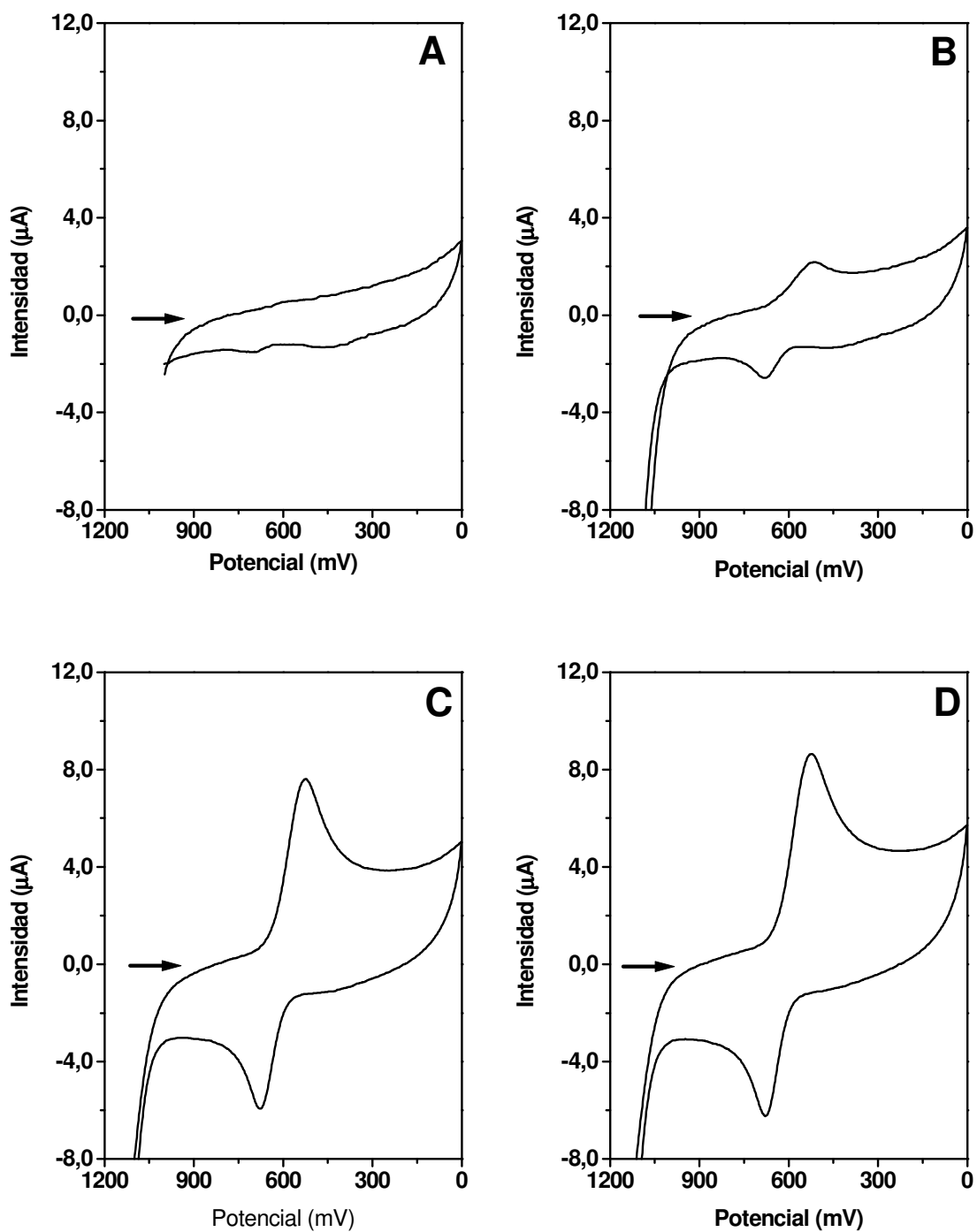


Figura 65.- Voltamperogramas cíclicos obtenidos aplicando diferentes potenciales iniciales de barrido: 1000 (A), 1100 (B), 1300 (C) y 1500 mV (D). Dirección del primer barrido: catódica. Resto condiciones igual que figura 64.



### C. Influencia de la velocidad de barrido

El estudio de la velocidad de barrido en voltamperometría de barrido lineal, permite establecer las características del proceso de oxidación.

*En procesos controlados por difusión, ya sean reversibles o irreversibles, la intensidad de pico es una función lineal de la raíz cuadrada de la velocidad de barrido<sup>119</sup>:*

$$I_p = kv^{1/2} \quad (28)$$

*En procesos donde únicamente especies adsorbidas son electroactivas, la intensidad de pico es función lineal de la velocidad de barrido<sup>119</sup>:*

$$I_p = kv \quad (29)$$

*Una representación gráfica de  $\log I_p$  frente al  $\log v$ , permitirá deducir, por el valor de su pendiente, el tipo de control de proceso. Dicha representación tendrá pendiente 0.5 en el caso de control por difusión y 1 en el caso de procesos controlados por adsorción<sup>119</sup>.*

Se realiza el estudio de la influencia de la velocidad de barrido sobre la intensidad de pico de la señal anódica de amitrol, Ox1. Para ello se utilizan disoluciones de amitrol en concentración 1.00, 2.50, 4.90 y 9.40 x 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup> en medio ácido fosfórico 0.026 mol L<sup>-1</sup>. Se registran los voltamperogramas de barrido lineal a diferentes velocidades de barrido comprendidas entre 5 y 200 mV s<sup>-1</sup>. El potencial inicial de barrido se fija en 0 mV y el potencial final en 1500 mV.

En la figura 66, se muestra la representación gráfica de la intensidad de pico de la señal anódica Ox1 frente a la raíz cuadrada de la velocidad de barrido, a las cuatro concentraciones de amitrol estudiadas.

La representación gráfica de la intensidad de pico frente a la raíz cuadrada de la velocidad de barrido, muestra una variación lineal en todo el margen de velocidades estudiado para una concentración de amitrol 1.00 x 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup>. A concentraciones mayores el margen de linealidad va disminuyendo con la concentración, siendo lineal hasta 100 mV s<sup>-1</sup> para una concentración de 2.50 x 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup>, hasta 50 mV s<sup>-1</sup> para una concentración de 4.90 x 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup> y hasta 25 mV s<sup>-1</sup> para una concentración de 9.40 x 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup>.

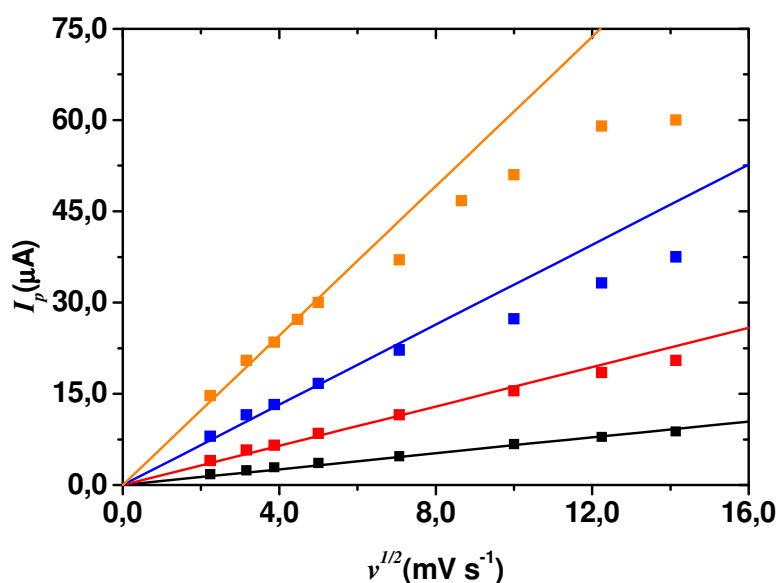


Figura 66.- Evolución de la intensidad de pico frente a la raíz cuadrada de la velocidad de barrido a diferentes concentraciones de amitrol:  $1.00 \times 10^{-4}$  (■),  $2.50 \times 10^{-4}$  (■),  $4.90 \times 10^{-4}$  (■) y  $9.40 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> (■). Medio: ácido fosfórico 0.026 mol L<sup>-1</sup>.

La tabla 27 presenta las ecuaciones de las rectas ajustadas, con sus coeficientes de correlación y el rango lineal, para las cuatro concentraciones de amitrol estudiadas.

Tabla 27.- Evolución de la intensidad de pico con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido

Concentración (mol L <sup>-1</sup> )	Ecuación	Rango lineal, r, n
$1.00 \times 10^{-4}$	$I_p (\mu\text{A}) = (0.65 \pm 0.01) v^{1/2} (\text{mV s}^{-1})^{1/2}$	(0-200) mV s <sup>-1</sup> r = 0.9991 (n=6)
$2.50 \times 10^{-4}$	$I_p (\mu\text{A}) = (1.62 \pm 0.03) v^{1/2} (\text{mV s}^{-1})^{1/2}$	(0-200) mV s <sup>-1</sup> r = 0.9990 (n=6)
$4.90 \times 10^{-4}$	$I_p (\mu\text{A}) = (3.29 \pm 0.08) v^{1/2} (\text{mV s}^{-1})^{1/2}$	(0-50) mV s <sup>-1</sup> r = 0.998 (n=5)
$9.40 \times 10^{-4}$	$I_p (\mu\text{A}) = (6.14 \pm 0.09) v^{1/2} (\text{mV s}^{-1})^{1/2}$	(0-25) mV s <sup>-1</sup> r = 0.998 (n=5)

Se representa también la evolución del logaritmo de la intensidad de pico de Ox1 con el logaritmo de la velocidad de barrido, representación que se recoge en la figura 67.

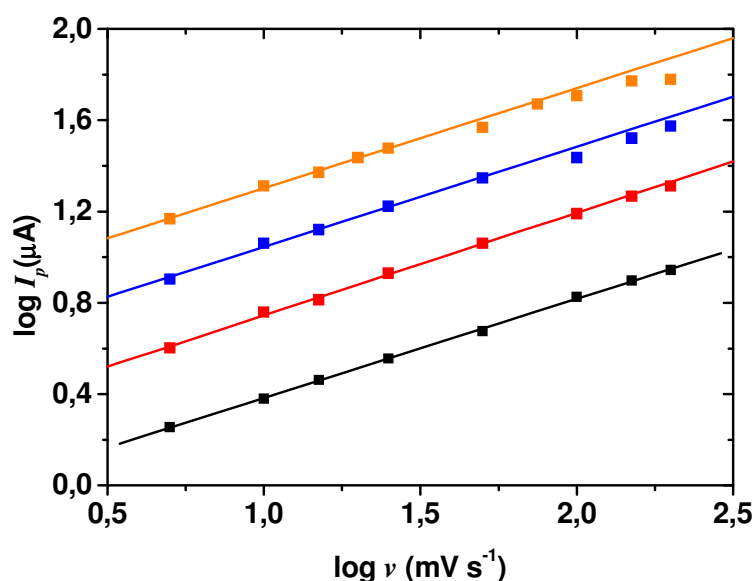


Figura 67-. Evolución del logaritmo de la intensidad de pico frente al logaritmo de la velocidad de barrido a diferentes concentraciones de amitrol:  $1.00 \times 10^{-4}$  (■),  $2.50 \times 10^{-4}$  (■),  $4.90 \times 10^{-4}$  (■) y  $9.40 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> (■). Medio: ácido fosfórico 0.026 mol L<sup>-1</sup>.

Como se observa en esta figura, el logaritmo de la intensidad de pico Ox1 presenta una variación lineal frente al logaritmo de la velocidad de barrido.

En la tabla 28 se muestran las ecuaciones de regresión ajustadas, junto con el coeficiente de correlación y el rango lineal, para cada una de las concentraciones de amitrol estudiadas.

Tabla 28.- Evolución del logaritmo de la intensidad de pico con el logaritmo de la velocidad de barrido

Concentración (mol L <sup>-1</sup> )	Ecuación	Rango lineal, r, n
$1.00 \times 10^{-4}$	$\text{Log } I_p (\mu\text{A}) = (-0.05 \pm 0.01) + (0.44 \pm 0.01) \log \nu (\text{mV s}^{-1})$	(0-200) mV s <sup>-1</sup> r= 0.998 (n=8)
$2.50 \times 10^{-4}$	$\text{Log } I_p (\mu\text{A}) = (0.30 \pm 0.01) + (0.45 \pm 0.01) \log \nu (\text{mV s}^{-1})$	(0-200) mV s <sup>-1</sup> r= 0.9993 (n=6)
$4.90 \times 10^{-4}$	$\text{Log } I_p (\mu\text{A}) = (0.61 \pm 0.02) + (0.44 \pm 0.01) \log \nu (\text{mV s}^{-1})$	(0-50) mV s <sup>-1</sup> r= 0.998 (n=5)
$9.40 \times 10^{-4}$	$\text{Log } I_p (\mu\text{A}) = (0.86 \pm 0.02) + (0.44 \pm 0.01) \log \nu (\text{mV s}^{-1})$	(0-25) mV s <sup>-1</sup> r= 0.9990 (n=5)

La pendiente de la representación gráfica del logaritmo de la intensidad de pico frente al logaritmo de la velocidad de barrido en todos los casos es próxima a 0.50. Estos hechos, indican que el proceso de oxidación de amitrol correspondiente a la onda Ox1 está controlado por difusión a bajas concentraciones de amitrol y bajas velocidades de barrido.

En la figura 68 se muestra la evolución de la relación  $I_p v^{-1/2}$  con la velocidad de barrido, para las diferentes concentraciones de amitrol estudiadas.

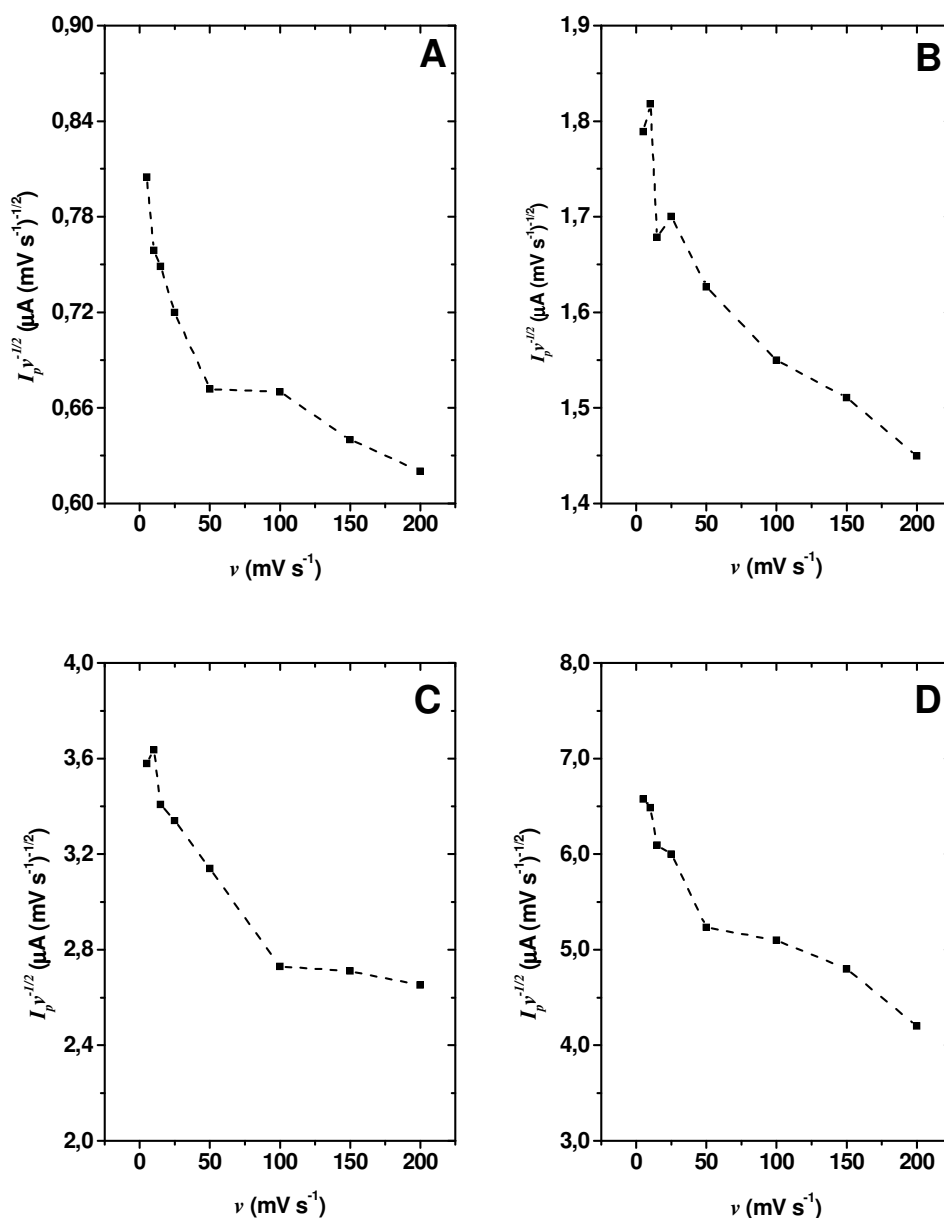


Figura 68.- Evolución de la relación  $I_p v^{-1/2}$  con la velocidad de barrido a diferentes concentraciones de amitrol:  $1.00 \times 10^{-4}$  (A),  $2.50 \times 10^{-4}$  (B),  $4.90 \times 10^{-4}$  (C) y  $9.40 \times 10^{-4}$  mol L $^{-1}$  (D). Medio: ácido fosfórico 0.026 mol L $^{-1}$ .

En ella puede observarse como la relación  $I_p v^{-1/2}$  disminuye con el aumento de la velocidad de barrido, siendo esta disminución más drástica a velocidades de barrido bajas. Este comportamiento es característico de un proceso electroquímico seguido de una reacción química posterior (mecanismo EC)<sup>119,122-124</sup>.

#### D. Influencia de la concentración

*Para ondas controladas por difusión, ya sean reversibles o irreversibles, existe una relación lineal entre la intensidad de pico y la concentración de la sustancia electroactiva<sup>119</sup>:*

$$I_p = kC \quad (30)$$

Se estudia la influencia de la concentración de amitrol en su señal anódica por voltamperometría de barrido lineal, para un intervalo de concentraciones del herbicida comprendido entre  $5.00 \times 10^{-5}$  y  $1.00 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> a diferentes velocidades de barrido, 20, 50 y 100 mV s<sup>-1</sup>.

En la figura 69 se muestran los voltamperogramas obtenidos a una velocidad de barrido de 20 mV s<sup>-1</sup>.

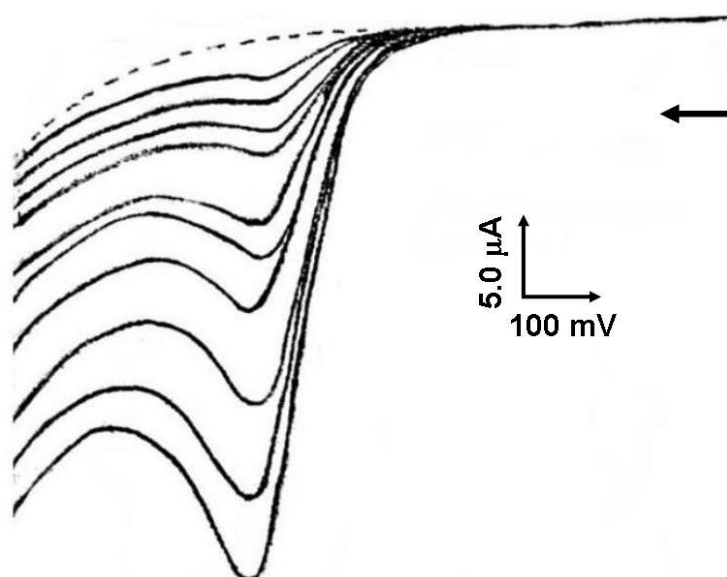


Figura 69.- Señal anódica Ox1 obtenida a diferentes concentraciones de amitrol:  $5.00 \times 10^{-5}$ ,  $1.00 \times 10^{-4}$ ,  $2.00 \times 10^{-4}$ ,  $3.00 \times 10^{-4}$ ,  $4.00 \times 10^{-4}$ ,  $4.90 \times 10^{-4}$ ,  $6.80 \times 10^{-4}$ ,  $8.60 \times 10^{-4}$  y  $1.00 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>. Medio de medida: ácido fosfórico 0.026 mol L<sup>-1</sup>, velocidad de barrido de 20 mV s<sup>-1</sup>.

En la figura 70 se observa la existencia de una relación lineal entre la intensidad de pico de Ox1 y la concentración de amitrol a las tres velocidades de barrido estudiadas. Para una velocidad de barrido de  $20 \text{ mV s}^{-1}$  la intensidad de pico muestra una relación lineal en todo el intervalo de concentraciones estudiado, en cambio con el aumento de la velocidad de barrido, el intervalo de linealidad se ve reducido, en el caso de una velocidad de barrido de  $50 \text{ mV s}^{-1}$  hasta una concentración de amitrol  $6.80 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  y en el caso de una velocidad de barrido de  $100 \text{ mV s}^{-1}$  hasta una concentración de  $4.00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ . La tabla 29 muestra los parámetros del ajuste lineal de la intensidad de pico frente a la concentración estudiada.

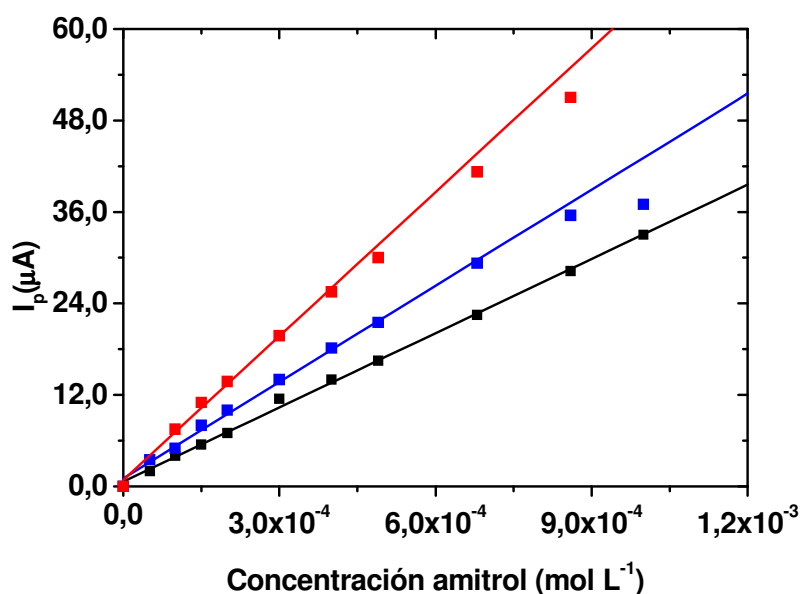


Figura 70.- Evolución de la intensidad de pico frente a la concentración de amitrol a diferentes velocidades de barrido: 20 (■), 50 (■) y  $100 \text{ mV s}^{-1}$  (■). Medio de medida: ácido fosfórico  $0.026 \text{ mol L}^{-1}$ .

Tabla 29.- Parámetros del ajuste lineal de la intensidad de pico frente a la concentración de amitrol

Velocidad ( $\text{mV s}^{-1}$ )	Pendiente (S)	Ordenada	r	Rango lineal ( $\text{mol L}^{-1}$ )
20	$(3.2 \pm 0.1) \times 10^4$	$0.6 \pm 0.2$	0.9991, (n=10)	0 - $1.0 \times 10^{-3}$
50	$(4.2 \pm 0.1) \times 10^4$	$1.1 \pm 0.3$	0.998, (n=9)	0 - $6.8 \times 10^{-4}$
100	$(6.3 \pm 0.2) \times 10^4$	$0.9 \pm 0.5$	0.998, (n=6)	0 - $4.0 \times 10^{-4}$

Pendiente:  $\mu\text{A L mol}^{-1}$  y ordenada en el origen:  $\mu\text{A}$ .

La existencia de una variación lineal entre la intensidad de pico y la concentración de amitrol permite la utilización de esta técnica para la determinación del herbicida,

alcanzándose una sensibilidad de  $4.2 \times 10^4 \mu\text{A L mol}^{-1}$  para una velocidad de barrido de  $50 \text{ mV s}^{-1}$ .

### D.1 Cálculo de los límites de detección y determinación

Los límites de detección y determinación se calculan a partir de la desviación típica de la señal del blanco, medida al potencial de pico, utilizando la siguiente expresión<sup>83</sup>:

$$C_L = \frac{kS_B}{S} \quad (31)$$

donde  $s_B$  es la desviación estándar del blanco y  $k$  es un factor numérico seleccionado de acuerdo con el nivel de confianza deseado, en el caso del cálculo del límite de detección, 3 es el valor recomendado, para el cálculo del límite de determinación  $k$  toma un valor de 10.

Para diez repeticiones de un blanco de electrolito ácido fosfórico  $0.026 \text{ mol L}^{-1}$ , a una velocidad de barrido  $50 \text{ mV s}^{-1}$ , se obtiene un límite de detección de  $1.1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  ( $0.92 \text{ mg L}^{-1}$ ) y un límite de determinación de  $3.6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  ( $3.0 \text{ mg L}^{-1}$ ).

### E. Estudios de adsorción en el electrodo

La señal anódica del amitrol, Ox1, disminuye en intensidad con la realización de barridos sucesivos, como se ha visto en los registros obtenidos por voltamperometría cíclica a diferentes pH (figuras 61 y 62, págs: 181 y 182). Por ello, se decide realizar diferentes estudios con el objetivo de comprobar si el propio amitrol, los productos de su oxidación o ambos, se adsorben en el electrodo provocando la contaminación de éste.

En el primer experimento, se introduce el electrodo previamente pulido en una disolución agitada de amitrol en concentración  $1.00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  en medio ácido fosfórico  $0.026 \text{ mol L}^{-1}$  a circuito abierto durante cinco minutos. Posteriormente se saca y se lava el electrodo con agua destilada y se introduce en una celda que contiene únicamente electrolito soporte. Se registran dos voltamperogramas cíclicos sucesivos entre 0 y 1600 mV, iniciando el barrido en dirección anódica a un potencial inicial de 1000 mV con una velocidad de barrido de  $50 \text{ mV s}^{-1}$ . El registro obtenido se muestra en la figura 71 A. En éste puede apreciarse la onda de oxidación de amitrol Ox1, a pesar de no haber amitrol en la disolución

de medida, como consecuencia de que el propio amitrol se adsorbe ligeramente bajo estas condiciones.

En el segundo experimento, se introduce el electrodo en una disolución agitada de amitrol  $1.00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  en medio ácido fosfórico  $0.026 \text{ mol L}^{-1}$ , y se aplica un potencial de 1300 mV durante cinco minutos. Se saca el electrodo, se lava con agua destilada, y se introduce en una disolución del electrolito soporte. Se realiza un voltamperograma cíclica entre 0 y 1600 mV, iniciando el barrido en reducción a un potencial inicial de 1600 mV. En la figura 71 B se muestra el registro obtenido. En éste, pueden observarse la aparición de las ondas del par redox (Red3/Ox3), por lo que se puede concluir que el producto de la oxidación del amitrol, presenta también, una ligera adsorción en la superficie del electrodo.

Por último se realizan seis barridos cíclicos entre 0 y 1600 mV en una disolución de amitrol en concentración  $1.00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  en medio ácido fosfórico  $0.026 \text{ mol L}^{-1}$  (figura 71 C) se saca el electrodo, se lava, se sumerge en una disolución del electrolito soporte y se registra un barrido cíclico en dirección anódica desde 600 mV (figura 71 D), se comprueba que tanto el amitrol como el producto de la reducción (Red 3) se adsorben en la superficie del electrodo.

Como resultados de estos estudios, se puede concluir que tanto el propio amitrol como el producto de su oxidación se adsorben ligeramente en la superficie del electrodo en las condiciones experimentales del estudio.



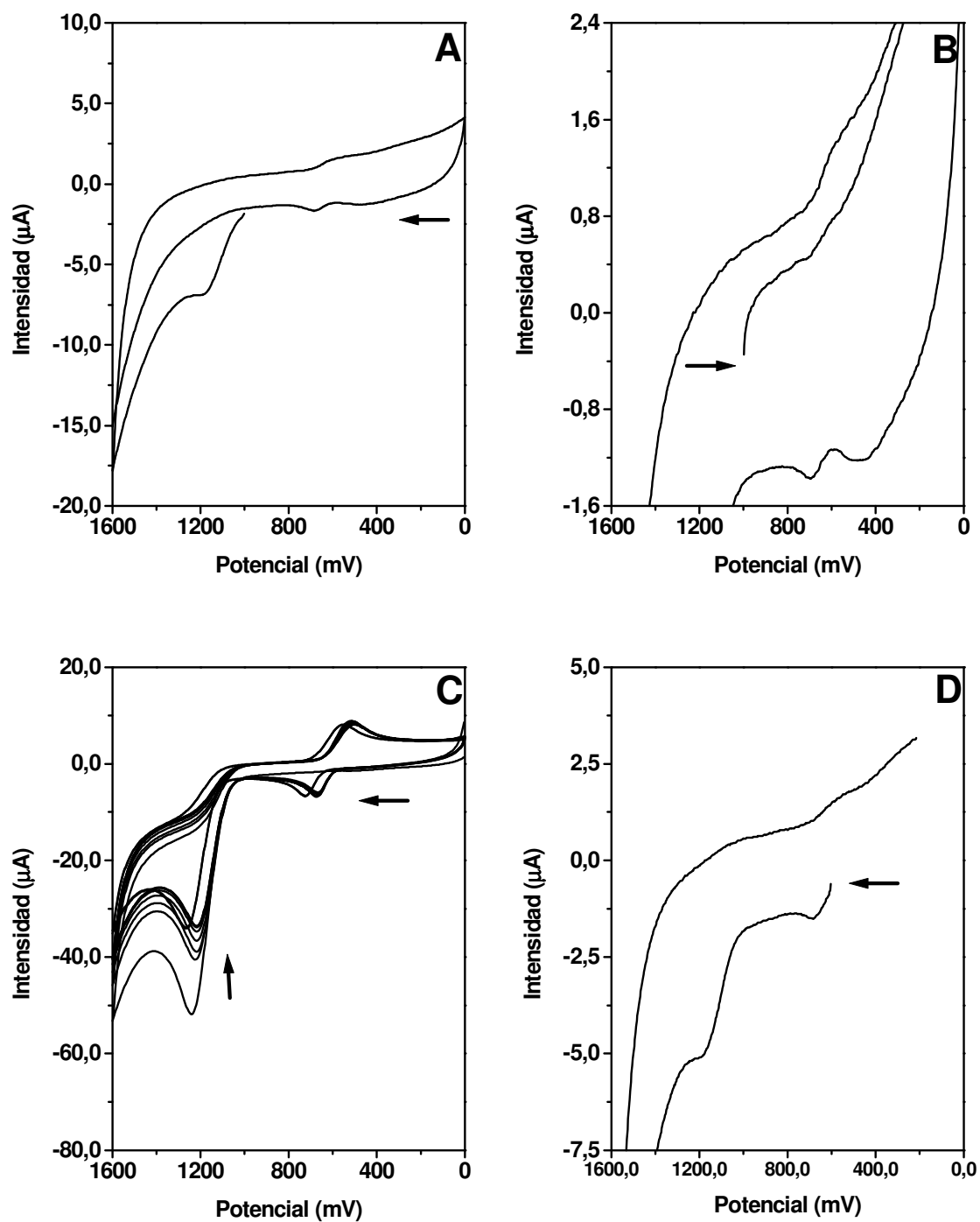


Figura 71.- Voltamperogramas cíclicos de los estudios de adsorción descritos en el texto. Medio de medida: ácido fosfórico  $0.026 \text{ mol L}^{-1}$ , velocidad de barrido  $50 \text{ mV s}^{-1}$ .

### 5.1.3 DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE ELECTRONES

#### A. Culombimetría a potencial controlado

Con el fin de conocer el número de electrones intercambiados por molécula de amitrol electrolizada, se realizan diversas culombimetrías a potencial controlado, empleando el método macroculombimétrico.

*Este método consiste en electrolizar cuantitativamente una determinada masa de sustancia electroactiva a potencial constante y medir la cantidad de electricidad (carga) puesta en juego en el proceso.*

*A partir de la expresión de la primera ley de Faraday:*

$$N(\text{moles}) = \frac{Q}{nF} \quad (32)$$

*donde  $Q$  [C] es la cantidad de electricidad empleada en producir o transformar  $N$  moles de sustancia. Se despeja  $n$ , ya que todo lo demás es conocido ( $N$  y  $F$ ) o puede medirse experimentalmente como es el caso de la carga ( $Q$ )<sup>121</sup>.*

Para realizar el proceso culombimétrico se emplea como electrodo de trabajo un electrodo de grafito cilíndrico de 10.0 cm de longitud y 5.0 mm de diámetro, el cual se activa en NaOH 0.10 mol L<sup>-1</sup> aplicando un potencial de 1200 mV durante 60 s antes del comienzo de la electrolisis. Como electrodo auxiliar se emplea una placa de platino (0.75 cm<sup>2</sup>).

La electrolisis se realiza en 20.0 mL de una disolución de amitrol 5.00 x 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup>. No es posible realizar la culombimetría con concentraciones de amitrol mayores ya que cuando se electrolizan concentraciones mayores del herbicida el experimento se para, posiblemente debido a un bloqueo del electrodo.

Se realizan distintas culombimetrías aplicando diferentes potenciales, 1100, 1200, 1300 y 1400 mV, pasando nitrógeno durante todo el proceso y se realiza el seguimiento del proceso culombimétrico por voltamperometría cíclica. En la figura 72, se muestran los registros obtenidos a diferentes tiempos de electrolisis, para una de las culombimetrías realizadas, puede comprobarse que al final de la electrolisis desaparece el pico (Ox1) y también desaparece el par (Red3/Ox3), lo que indicaría que el par se debe a alguna especie

intermedia no estable del proceso global de oxidación, que las especies del par redox se quedan adsorbidas en el macroelectrodos o ambas cosas a la vez.

En la tabla 30 se muestran los resultados obtenidos para los diferentes potenciales de electrolisis.

Tabla 30.- Resultados obtenidos en los estudios culombimétricos de amitrol a diferentes potenciales.

Potencial (mV)	$Q_{neta}$ (C)	$n^{\circ}$ de electrones
1100	3.9±0.2	4.1±0.3, n=3
1200	4.1±0.3	4.2±0.2, n=3
1300	4.3±0.4	4.4±0.3, n=3
1400	3.6±0.1	3.7±0.2, n=3

En todos los casos, 4 es el número de electrones involucrados en la reacción global.

Durante la realización de todas estas culombimetrías se observa además, la generación de burbujas en la superficie del electrodo. Este hecho indica que algún/os producto/s generado/s durante el proceso son gases.

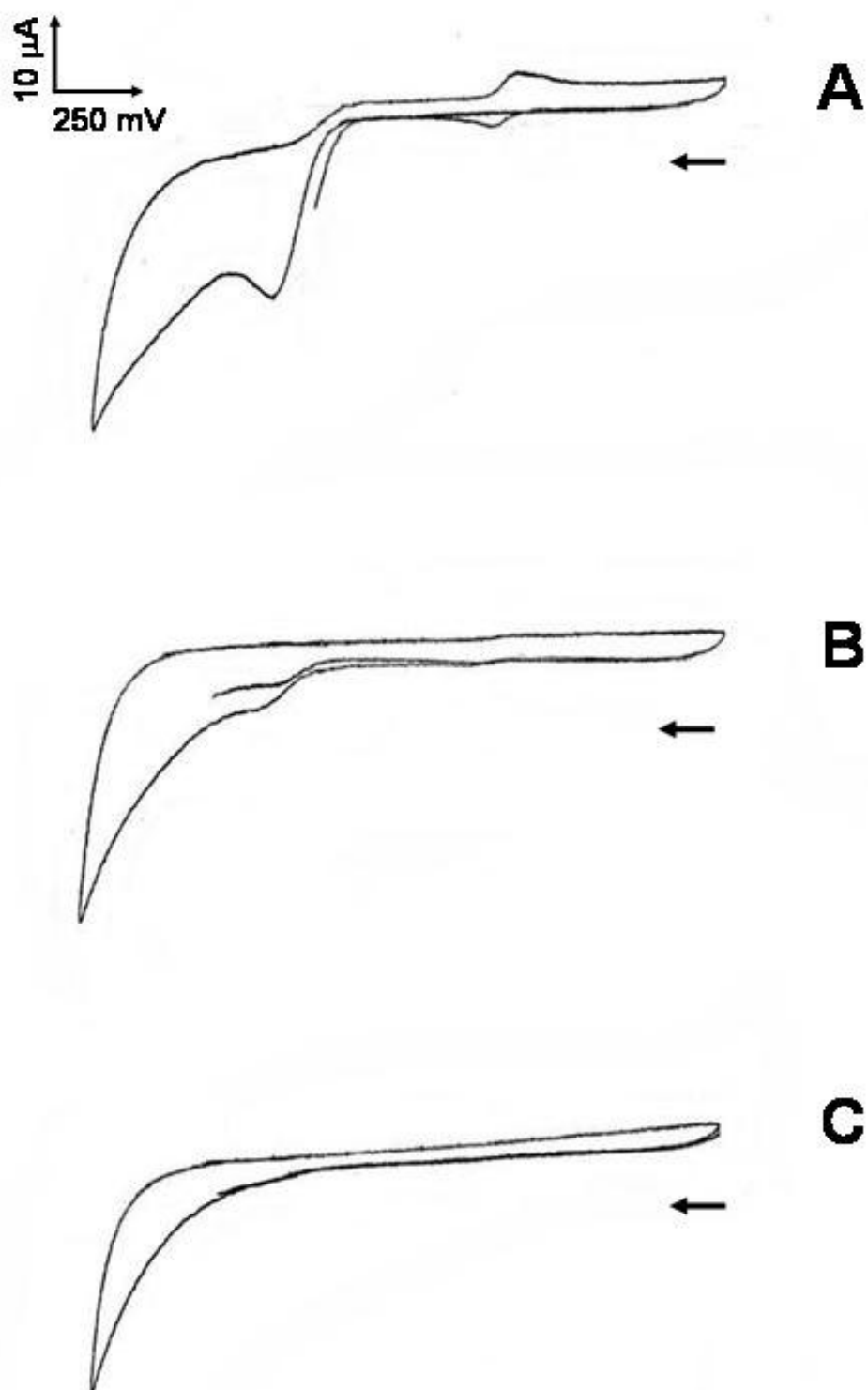


Figura 72-. Voltamperogramas cíclicos obtenidos a diferentes tiempos de la coulombimetría: 0 s (A), 3600 s (B) y 4800 s (C), realizada sobre 20 mL de amitrol  $5.00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  en ácido fosfórico  $0.026 \text{ mol L}^{-1}$  aplicando un voltaje de 1400 mV. Potencial inicial: -100 mV, potencial final 1700 mV, velocidad de barrido:  $50 \text{ mV s}^{-1}$ .

## B. Voltamperometría de barrido lineal

El número de electrones globales involucrados en una reacción electroquímica puede ser evaluado a partir de la pendiente obtenida de la evolución de la intensidad de pico con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido, conociendo el valor de cada uno de los demás parámetros de la ecuación.

*Para un sistema irreversible controlado difusionalmente, la corriente de pico viene dada por la siguiente ecuación<sup>121</sup>:*

$$I_p = 2.99 \times 10^5 n(\beta n_\beta)^{1/2} ACD^{1/2} v^{1/2} \quad (33)$$

*donde  $I_p$  [A] es la intensidad de pico,  $n$  el número de electrones globales de la reacción electroquímica,  $\beta$  el coeficiente de transferencia de carga anódico,  $n_\beta$  el número de electrones de la etapa limitante de la velocidad del proceso y  $v$  [ $V s^{-1}$ ] la velocidad de barrido.*

Se ha estimado el número de electrones involucrados en el proceso electródico a partir del valor de las pendientes obtenidas en el estudio de la variación de la intensidad de pico con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido (pág 189), a las cuatro concentraciones diferentes de amitrol estudiadas. Para este cálculo se han tomado como valor del coeficiente de difusión de amitrol, los valores estimados en los estudios de electroforesis capilar ( $2.5 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ , pág 83) y de voltamperometría de electrodo rotatorio ( $1.6 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ , pág 207); el valor de  $\beta n_\beta$  (0.46. pág 212) del sistema, calculado a partir de la evolución del potencial de pico con el logaritmo de la velocidad de barrido; y el valor del área efectiva del electrodo ( $A = 0.058 \text{ cm}^2$ , pág 178). Con todo ello, el valor del número de electrones estimado es de  $3.9 \pm 0.5$  ( $n=8$ ), valor que coincide con el obtenido experimentalmente en el estudio coulombimétrico.

### 5.1.4 ESTUDIOS EN ELECTRODO ROTATORIO

Las llamadas “técnicas hidrodinámicas” implican un transporte de masa convectivo tanto de los reactivos como de los productos de la reacción electroquímica desde el seno de la disolución a la superficie del electrodo. Estas técnicas presentan como ventaja el hecho de alcanzar rápidamente un estado estacionario que permite llevar a cabo las medidas con bastante precisión.

Uno de los pocos sistemas electródicos convectivos, para los cuales las ecuaciones hidrodinámicas y la ecuación de difusión-convección han sido resueltas rigurosamente en el estado estacionario, es el electrodo de disco rotatorio.

*Los voltamperogramas obtenidos empleando un electrodo rotatorio, son curvas i-E sigmoidales en las que se alcanza una meseta de corriente límite. La ecuación de esta corriente límite se conoce por “ecuación de Levich” y ya ha sido descrita en la sección 5.1.1.A de este mismo capítulo:*

$$I_l = 0.620nFAD^{2/3}\omega^{1/2}\nu^{-1/6}C \quad (27)$$

*Esta ecuación se aplica, a la condición de limitación total por transferencia de masa sobre un electrodo de disco rotatorio y predice que la intensidad límite ( $I_l$ ) es proporcional a la raíz cuadrada de la velocidad de rotación ( $\omega^{1/2}$ ) a un valor de concentración ( $C$ ) determinada. Así una representación gráfica de  $I_l$  frente a  $\omega^{1/2}$  que sea lineal y pase por el origen es una excelente prueba de que dicha corriente está controlada por difusión. Una desviación de la representación de corriente límite frente a la raíz cuadrada de la velocidad de rotación de una línea recta que pase por el origen, sugiere que hay alguna etapa cinética implicada en la reacción de transferencia electrónica<sup>119,121</sup>.*

*En los sistemas irreversibles de primer orden, la corriente faradaica depende simultáneamente de dos procesos; por un lado de la velocidad de la reacción electródica, y por otro, de la transferencia de masa de sustancia electroactiva a la superficie del electrodo. La inversa de la corriente faradaica ( $I^{-1}$ ) puede expresarse como una función lineal de la inversa de la velocidad de rotación ( $\omega^{-1/2}$ ) por la ecuación de Koutecky-Levich (KL)<sup>121</sup>:*

$$\frac{1}{I} = \frac{1}{I_k} + \frac{1}{I_l} \quad (34)$$

donde  $I$  [A] es la corriente faradaica,  $I_k$  [A] es la corriente en ausencia de efectos debidos a la transferencia de masa, denominada "corriente cinética" e  $I_l$  [A] es la corriente debida a la transferencia de masa, denominada "corriente difusional".

La corriente cinética ( $I_k$ ), es independiente de la velocidad de rotación y proporcional a la concentración de sustancia electroactiva en disolución según la ecuación:

$$I_k = n F A k_h C \quad (35)$$

donde  $k_h$  [ $\text{cm s}^{-1}$ ] es la constante heterogénea de velocidad del proceso electródico.

La corriente difusional ( $I_l$ ) es proporcional a la raíz cuadrada de la velocidad de rotación y a la concentración de sustancia electroactiva en disolución según la ecuación de Levich (expresión 27).

Por todo esto, la representación gráfica de la inversa de la corriente faradaica ( $I^{-1}$ ) frente a la inversa de la velocidad de rotación ( $\omega^{-1/2}$ ) a un potencial determinado, deberá ser una línea recta, de cuya ordenada en el origen se obtendrá el valor de la componente cinética y cuya pendiente vendrá dada por:

$$\text{pendiente} = (0.62n F D^{2/3} \nu^{-1/6} A C)^{-1} \quad (36)$$

## A. Cumplimiento de las ecuaciones de Levich y Koutecky-Levich

Con el fin de comprobar el cumplimiento de la ecuación de Levich, se estudia el comportamiento del amitrol sobre un electrodo rotatorio de "glassy carbon", observando como se modifica la intensidad límite al variar la concentración del herbicida y la velocidad de rotación del electrodo.

Se registran las curvas intensidad-potencial de amitrol a diferentes frecuencias de rotación comprendidas entre 0 y 10000 rpm, utilizando disoluciones de amitrol a distintas concentraciones,  $1.00 \times 10^{-4}$ ,  $5.00 \times 10^{-4}$  y  $1.00 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>, en medio ácido fosfórico 0.026 mol L<sup>-1</sup>. La velocidad de barrido elegida es de 10 mV s<sup>-1</sup>. Los voltamperogramas hidrodinámicos obtenidos a las tres concentraciones estudiadas se muestran en la figura 73.

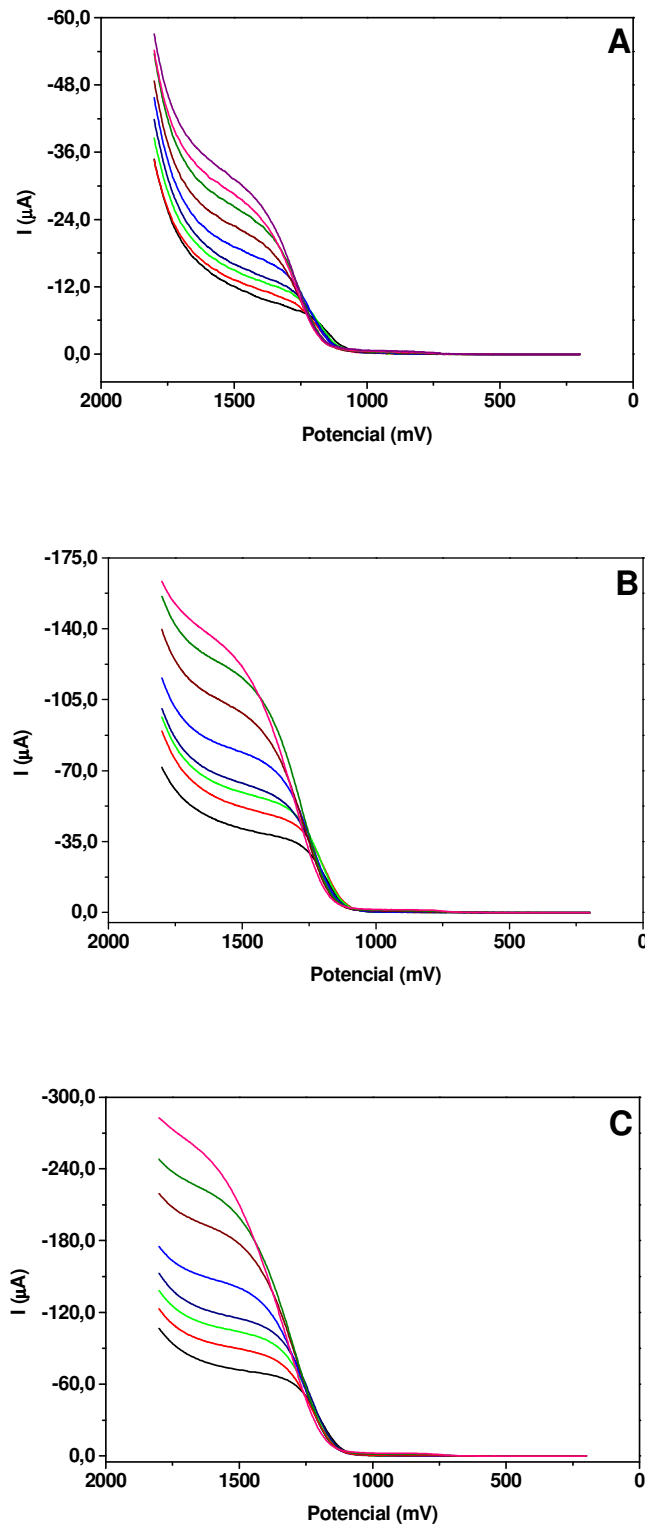


Figura 73.- Curvas intensidad potencial de amitrol a diferentes velocidades de rotación: 250 (—), 500 (—), 750 (—), 1000 (—), 2000 (—), 4000 (—), 6000 (—), 8000 (—) y 10000 rpm (—) a tres concentraciones de amitrol:  $1.00 \times 10^{-4}$  (A),  $5.00 \times 10^{-4}$  (B) y  $1.00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  (C). Velocidad de barrido  $10 \text{ mV s}^{-1}$ .



Como se puede observar en la figura 73, al aumentar la velocidad de rotación, las ondas se van desplazando a potenciales mayores, llegando un momento en el cual no hay un establecimiento de corriente límite como consecuencia del solapamiento de la onda con la de oxidación del electrolito. Esto puede deberse a la existencia una reacción química posterior a la reacción electroquímica. Si se da una reacción química posterior, ésta afecta a la rapidez con la que desaparece la especie oxidada de la superficie del electrodo y por lo tanto la curva  $i$ - $E$  se ve modificada<sup>119</sup>.

En la figura 74 se ha representado la evolución de corriente límite medida a 1500 mV frente a la raíz cuadrada de la velocidad de rotación a frecuencias comprendidas entre 250 y 3000 rpm, para las tres concentraciones de amitrol estudiadas. Se observa que existe relación lineal de la corriente límite con la velocidad de barrido (tabla 31), pero a pesar de ello, todas las rectas presentan ordenada en el origen, lo que sugiere la existencia de una componente cinética en la reacción electródica.

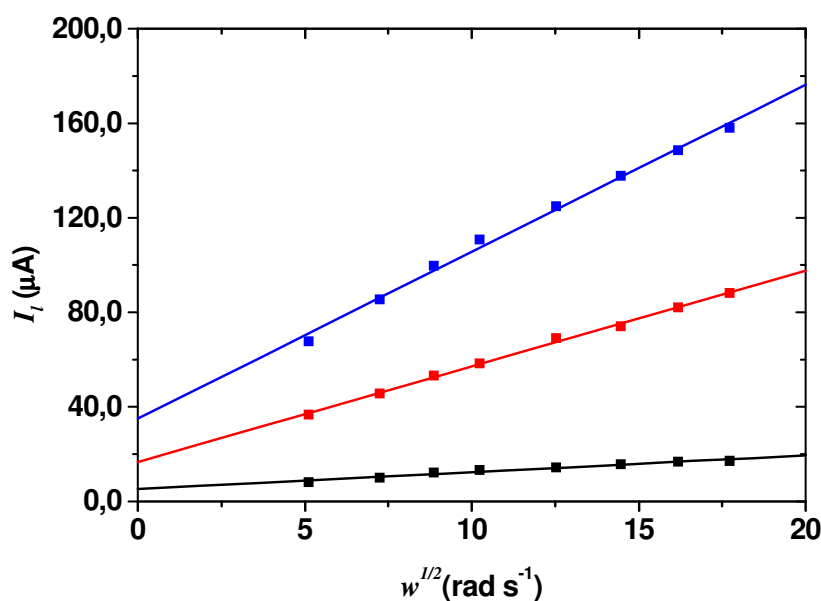


Figura 74.-Influencia de la velocidad de rotación en la intensidad límite (medida a 1.5 V) a diferentes concentraciones de amitrol:  $1.00 \times 10^{-4}$  (■),  $5.00 \times 10^{-4}$  (■) y  $1.00 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>(■). Resto de condiciones igual que figura 73.

Tabla 31.- Intensidad límite frente a raíz cuadrada de la velocidad de rotación.

[Amitrol] mol L <sup>-1</sup>	$I$ frente $w^{1/2}$
$1.00 \times 10^{-4}$	$I_1 = (5.2 \pm 0.6) \times 10^{-6} + (7.1 \pm 0.5) \times 10^{-7} w^{1/2}$ , $n = 8$ , $r = 0.990$
$5.00 \times 10^{-4}$	$I_1 = (2.2 \pm 0.1) \times 10^{-5} + (3.9 \pm 0.1) \times 10^{-6} w^{1/2}$ , $n = 8$ , $r = 0.996$
$1.00 \times 10^{-3}$	$I_1 = (3.5 \pm 0.2) \times 10^{-5} + (7.1 \pm 0.1) \times 10^{-6} w^{1/2}$ , $n = 8$ ; $r = 0.998$

Intensidad límite medida a 1500 mV; Pendiente: A s<sup>1/2</sup> rad<sup>-1/2</sup>, Ordenada: A

La representación de inversos a 1500 mV, para las tres concentraciones estudiadas de amitrol se muestra en la figura 75, y las ecuaciones de regresión en la tabla 32.

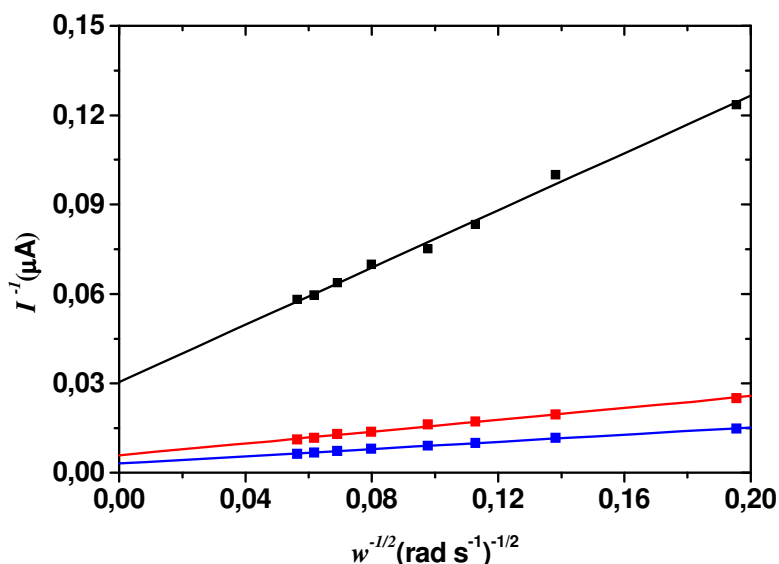


Figura 75.- Evolución de la inversa de la corriente límite con la inversa de la velocidad de rotación a diferentes concentraciones de amitrol:  $1.00 \times 10^{-4}$  (■),  $5.00 \times 10^{-4}$  (■) y  $1.00 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> (■). Condiciones igual que figura 73.

Tabla 32.- Intensidad límite frente a la inversa de la raíz cuadrada de la velocidad de rotación

[Amitrol] mol L <sup>-1</sup>	$I^{-1}$ frente $w^{-1/2}$
$1.00 \times 10^{-4}$	$I^{-1} = (3.1 \pm 0.2) \times 10^4 + (4.8 \pm 0.1) \times 10^5 w^{-1/2}$ , $n = 8$ , $r = 0.998$
$5.00 \times 10^{-4}$	$I^{-1} = (5.9 \pm 0.3) \times 10^3 + (9.9 \pm 0.3) \times 10^4 w^{-1/2}$ , $n = 8$ , $r = 0.996$
$1.00 \times 10^{-3}$	$I^{-1} = (3.1 \pm 0.1) \times 10^3 + (6.1 \pm 0.1) \times 10^4 w^{-1/2}$ , $n = 7$ ; $r = 0.9990$

Intensidad límite medida a 1500 mV, Pendiente: A<sup>-1</sup> rad<sup>1/2</sup>s<sup>-1/2</sup>, Ordenada: A<sup>-1</sup>

De la ordenada en el origen de estas ecuaciones (Tabla 32) se obtiene el valor de la componente cinética en la corriente límite a las tres concentraciones de amitrol estudiadas. Representando su valor frente a la concentración de amitrol (figura 76) se obtienen una variación lineal de ecuación:

$$I_k = (3.26 \pm 0.05) \times 10^2 C, n=3, r= 0.9995$$

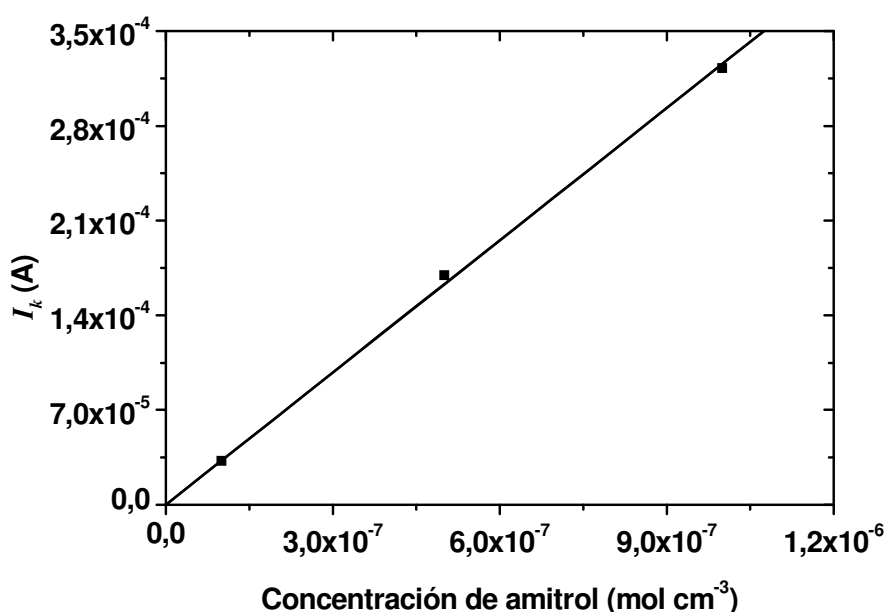


Figura 76-. Evolución de la componente cinética ( $I_k$ ) en la corriente límite ( $I$ ) medida a 1500 mV con la concentración de amitrol. Resto de condiciones igual que figura 73.

A partir de la pendiente de esta recta se puede obtener el valor de la constante de velocidad heterogénea del proceso electrodo, según la expresión 35 (pág 203). Para  $n = 4$ ,  $k_h$  resulta ser de  $1.5 \times 10^{-2} \text{ cm s}^{-1}$ .

De la misma forma, del valor de la pendiente de las ecuaciones mostradas en la tabla 32, es posible obtener el valor del coeficiente de difusión del amitrol. Para  $n = 4$ , se obtiene un valor para el coeficiente de difusión de  $(1.6 \pm 0.3) \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  ( $n=3$ ).

El valor obtenido es del mismo orden de magnitud que el obtenido en los estudios anteriores, por electroforesis capilar (pág 83), donde se obtuvo un valor del coeficiente de difusión de amitrol de  $2.5 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ .

## B. Influencia de la temperatura en la corriente límite

A partir del estudio de la influencia de la temperatura en la corriente límite se puede establecer si la corriente límite está controlada por difusión o si por el contrario está controlada cinética o catalíticamente de forma parcial o total.

*Se han establecido aumentos de la corriente límite cercanos al 1.3 % por grado de temperatura cuando los procesos están gobernados por difusión y aumentos mucho mayores del 2 % para procesos controlados cinética o catalíticamente<sup>125,126</sup>.*

*Meites<sup>126</sup>, calcula los coeficientes de temperatura (Coef T<sup>a</sup>%) mediante la expresión:*

$$\text{Coef } T^a \% = \frac{2.303}{\Delta T} \log\left(\frac{i_2}{i_1}\right) \times 100 \quad (37)$$

*Donde  $\Delta T$  es el incremento de temperatura de la disolución ( $t_2 - t_1$ ), e  $i_1$ ,  $i_2$  son las corrientes límites a  $t_1$  y  $t_2$  respectivamente.*

Se estudia la influencia de la temperatura en la corriente límite a una velocidad de rotación de 2000 rpm y una concentración de amitrol  $5.00 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> en ácido fosfórico 0.026 mol L<sup>-1</sup>. Para ello se varía la temperatura de la disolución entre 15 y 40 °C con el fin de obtener el valor del coeficiente de elevación de la corriente límite.

Como se muestra en la figura 77 existe una variación lineal del logaritmo de la corriente límite con la temperatura.

Los valores del coeficiente de temperatura obtenidos en el estudio se muestran en la tabla 33. El valor medio de este coeficiente es de 2.6 %, lo que corrobora, la existencia de una componente cinética en la señal analítica de amitrol.

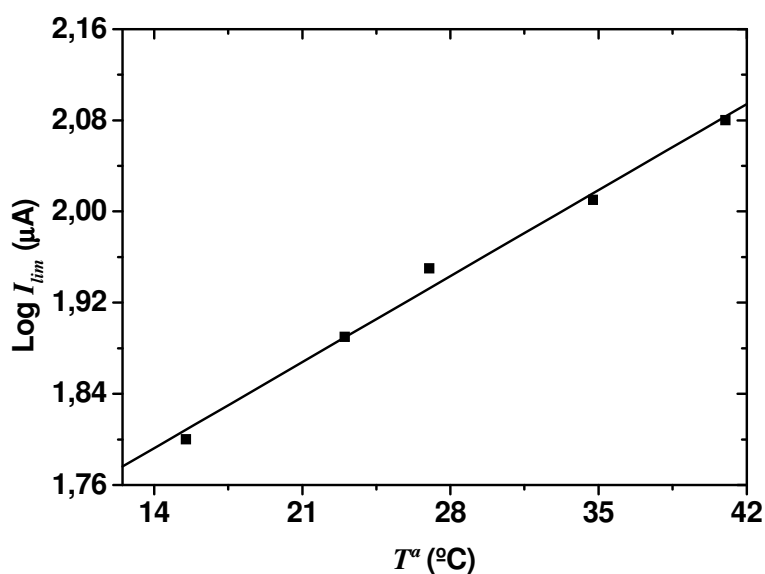


Figura 77.- Evolución del logaritmo de la corriente límite con la temperatura para una concentración de amitrol de  $5.00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ . Velocidad de rotación 2000 rpm, velocidad de barrido:  $10 \text{ mV s}^{-1}$ .

Tabla 33.- Valores de los coeficientes de temperatura

$T^{\circ}$	$I_l (\mu\text{A})$	$\text{Log } I_l$	Coef. $T^{\circ}$
15.5	63.6	1.80	
23.0	77.3	1.89	2.59
27.0	88.6	1.95	3.42
34.5	101.3	2.01	1.72
41.0	119.1	2.08	2.60

### C. Influencia de la concentración de amitrol

Se estudia la influencia de la concentración de amitrol a dos frecuencias de rotación, 1000 y 3000 rpm, para un rango de concentraciones de amitrol comprendido entre  $4.00 \times 10^{-5}$  y  $1.00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ . En la figura 78 se muestra la representación gráfica de la evolución de la corriente límite frente a la concentración de amitrol. La corriente límite es función lineal de la concentración a las dos velocidades de rotación estudiadas.

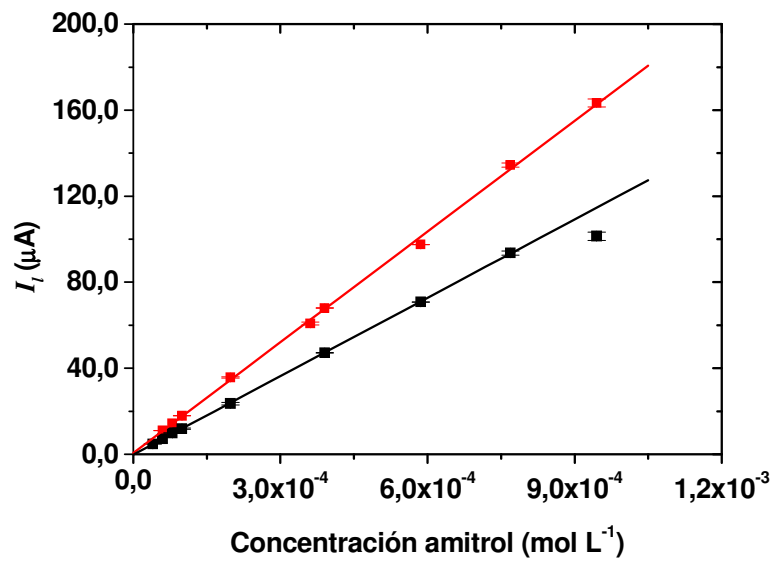


Figura 78.- Evolución de la corriente límite con la concentración de amitrol a dos velocidades de rotación: 1000 rpm (■) y 3000 rpm (■). Velocidad de barrido  $10 \text{ mV s}^{-1}$ . Se incluye la desviación estándar de cada punto ( $n = 3$ ).

En la tabla 34 se muestran las ordenadas en el origen y las pendientes, junto con los coeficientes de correlación lineal de las ecuaciones de regresión obtenidas en ambos casos.

Tabla 34.- Parámetros de calibrado

Velocidad (rpm)	Pendiente (S)	Ordenada	r	n
1000	$(1.21 \pm 0.01) \times 10^5$	$(-0.1 \pm 0.2)$	0.9997	8
3000	$(1.72 \pm 0.02) \times 10^5$	$(1 \pm 1)$	0.9995	9

Pendiente:  $\mu\text{A L mol}^{-1}$  y ordenada en el origen:  $\mu\text{A}$ .

## 5.1.5 MECANISMO ELECTRÓDICO

### A. Reversibilidad

#### A.1 Estudios en régimen no estacionario

A partir de los estudios de la velocidad de barrido ya descritos (pág 189), es posible establecer características de la reversibilidad del proceso electroquímico.

*El coeficiente de transferencia de carga por el número de electrones involucrados en la etapa limitante de la velocidad ( $\beta n_\beta$ ) del proceso electroquímico, se puede calcular a partir del valor de la pendiente de Tafel ( $b$ ) del sistema<sup>119</sup>:*

$$b = \frac{2.303RT}{\beta n_\beta F} \quad (38)$$

*En el caso de los procesos irreversibles controlados por difusión, es posible determinar el valor de esta pendiente a partir de la variación del potencial de pico con la velocidad de barrido según la siguiente ecuación<sup>121,127</sup>:*

$$E_p = \left(\frac{b}{2}\right) \log v + const. \quad (39)$$

*donde  $E_p$  [V] es el potencial de pico,  $v$  [ $V s^{-1}$ ] la velocidad de barrido y  $b$  [V/dec] la pendiente de Tafel.*

En la figura 79 se muestra la evolución del potencial de pico con el logaritmo de la velocidad de barrido obtenida a tres de las concentraciones de amitrol estudiadas.

El potencial de pico se desplaza hacia valores más positivos con el aumento de la velocidad de barrido, siendo característico de un proceso irreversible.<sup>119,120</sup>

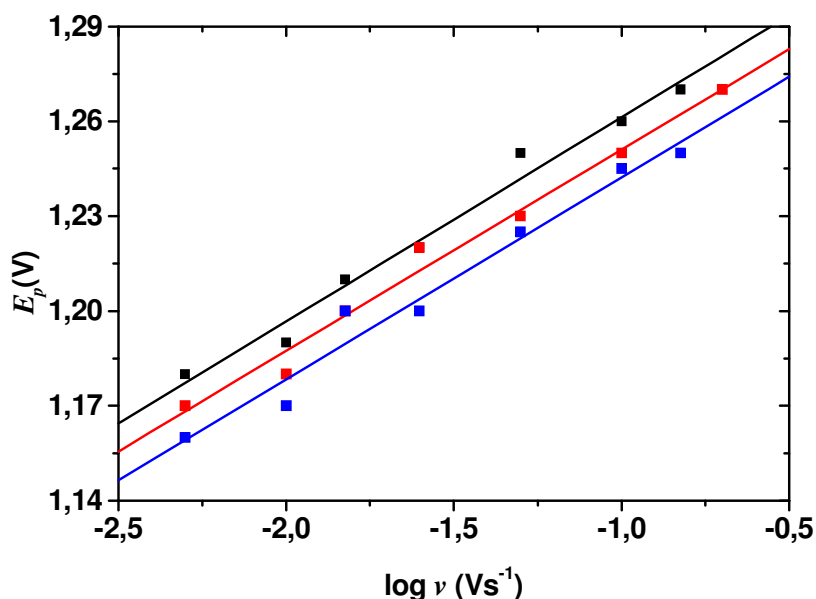


Figura 79.- Evolución del potencial de pico con el logaritmo de la velocidad de barrido a diferentes concentraciones de amitrol:  $1.00 \times 10^{-4}$  (■),  $4.90 \times 10^{-4}$  (■) y  $9.40 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> (■). Medio: ácido fosfórico 0.026 mol L<sup>-1</sup>.

En la tabla 35 se muestra el valor de las pendientes de Tafel obtenidas, así como el valor de  $\beta n_{\beta}$  para las diferentes concentraciones de amitrol.

Tabla 35.- Valores de la pendiente de Tafel y  $\beta n_{\beta}$  calculados a diferentes concentraciones de amitrol

[Amitrol] (mol L <sup>-1</sup> )	$1.00 \times 10^{-4}$	$4.90 \times 10^{-4}$	$9.40 \times 10^{-4}$	Valores medios
$b$ (V/dec)	0.128	0.128	0.130	$0.129 \pm 0.001$
$\beta n_{\beta}$	0.46	0.46	0.45	$0.46 \pm 0.01$

A la vista de los resultados obtenidos y asumiendo un valor para el coeficiente de transferencia de carga ( $\beta$ ) de 0.46, valor muy usual, la etapa limitante de la velocidad involucra un único electrón.



## A.2 Estudios en régimen estacionario

El cálculo de los parámetros cinéticos de una reacción electroquímica,  $\beta$  (coeficiente de transferencia de carga) y  $k^0$  (Constante heterogénea estándar condicional de velocidad de la reacción electroquímica), se puede realizar a partir de la ecuación de Tafel<sup>119</sup>:

$$\log I_k = \log(nFAk^0) + \frac{\beta nF}{2.303RT} (E - E^0) \quad (40)$$

esta expresión se obtiene sustituyendo la expresión de la constante heterogénea de velocidad ( $k_h$ ):

$$k_h(E) = k^0 \exp\left(\frac{\beta n F}{RT} (E - E^0)\right) \quad (41)$$

en la expresión de la corriente cinética ( $I_k$ ) ya descrita anteriormente:

$$I_k = nFAk_h(E)C \quad (35)$$

En nuestro caso, los parámetros cinéticos se han calculado tomando como referencia el potencial de onda media, cuyo valor es 1200 mV, dado que el potencial formal condicional no ha sido posible calcularlo<sup>128</sup>.

El estudio se lleva a cabo para una concentración de amitrol de  $5.00 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> y frecuencias de rotación comprendidas entre 250 y 1500 rpm, no siendo posible trabajar a frecuencias de rotación mayores debido al desplazamiento de la onda, comentado anteriormente.

En la figura 80 A se muestra la representación gráfica de Koutecky-Levich a diferentes valores de potencial y en la tabla 36 el valor de  $I_k$  obtenido a cada uno de estos valores.

Posteriormente se representa el logaritmo de la componente cinética, obtenida de la gráfica de Koutecky-Levich a cada uno de los potenciales, frente al potencial menos el potencial de onda medio. El gráfico obtenido se muestra en la figura 80 B.

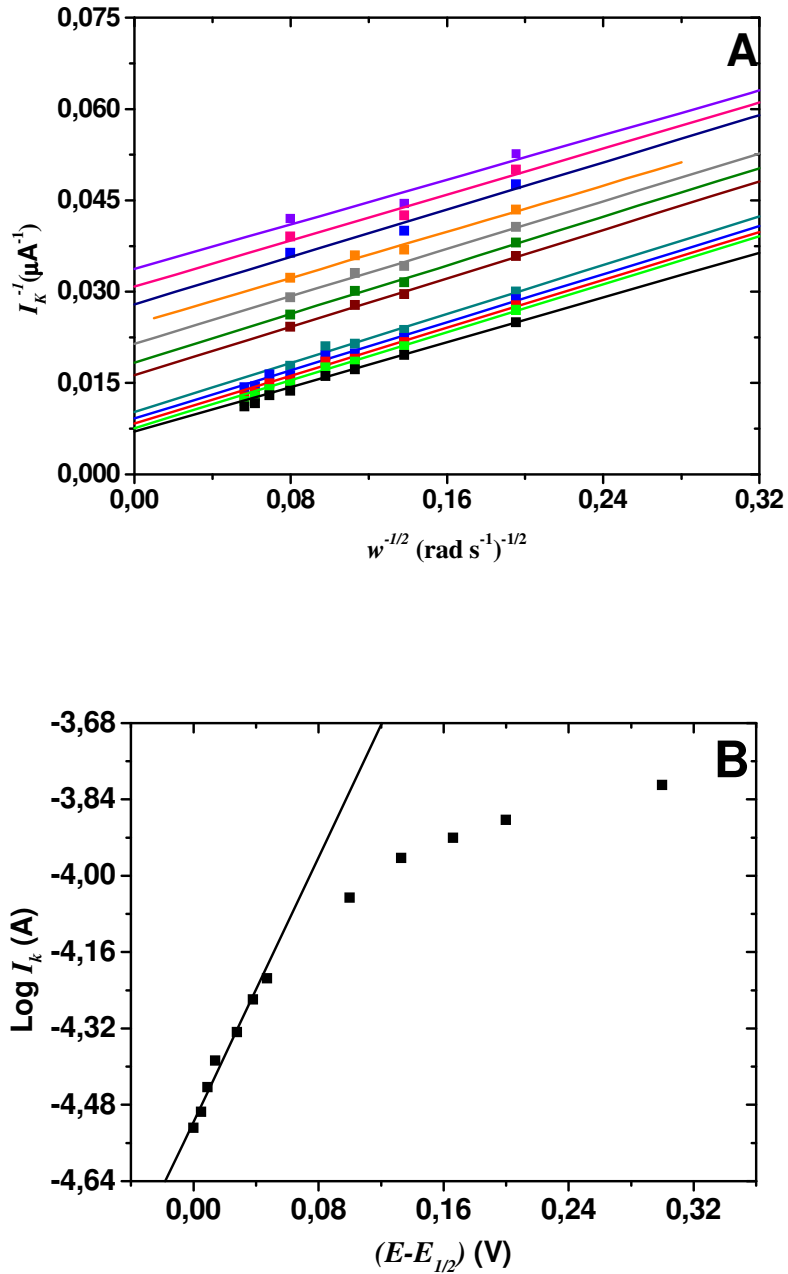


Figura 80.- Grafico de Koutecky-Levich a diferentes potenciales (A): 1500 (■), 1400 (■), 1366 (■), 1333 (■), 1300 (■), 1247 (■), 1238 (■), 1228 (■), 1214 (■), 1209 (■), 1205 (■) y 1200 mV (■), y representación grafica del  $\log I_k$  frente a  $(E-E_{1/2})$  (B). Concentración de amitrol  $5.00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ , resto de condiciones igual que en figura 73.

Tabla 36.- Valores de la corriente cinética ( $I_k$ ) obtenida a diferentes potenciales

Potencial (mV)	$I_k^{-1}$ (A)	$I_k$ (A)
1200	$3.4 \times 10^4$	$3.0 \times 10^{-5}$
1205	$3.1 \times 10^4$	$3.2 \times 10^{-5}$
1209	$2.8 \times 10^4$	$3.6 \times 10^{-5}$
1214	$2.4 \times 10^4$	$4.1 \times 10^{-5}$
1228	$2.1 \times 10^4$	$4.7 \times 10^{-5}$
1238	$1.8 \times 10^4$	$5.5 \times 10^{-5}$
1247	$1.6 \times 10^4$	$6.1 \times 10^{-5}$
1300	$1.0 \times 10^4$	$9.0 \times 10^{-5}$
1333	$9.2 \times 10^3$	$1.1 \times 10^{-4}$
1366	$8.3 \times 10^3$	$1.2 \times 10^{-4}$
1400	$7.6 \times 10^3$	$1.3 \times 10^{-4}$
1500	$7.0 \times 10^3$	$1.4 \times 10^{-4}$

De la ecuación de la recta obtenida:

$$\log I_k = (-4.52 \pm 0.01) + (7.0 \pm 0.3) (E - 1.200), n=7, r=0.997,$$

A partir del valor de la ordenada se obtiene un valor de  $nk^{0'}$  de  $1.1 \times 10^{-2} \text{ cm s}^{-1}$ , para  $n=4$ ,  $k^{0'} = 2.7 \times 10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$ , este valor es del mismo orden de magnitud que el encontrado por **Zen y col<sup>62</sup>** en un electrodo modificado químicamente. El valor de  $k^{0'}$  se podría atribuir a una reacción de transferencia electrónica lenta lo que sería consistente con la limitación cinética mostrada en los gráficos de Levich.

De la pendiente de la recta se obtiene un valor para  $\beta n_\beta$  de 0.41, valor similar al calculado en los estudios en régimen no estacionario, donde se obtuvo un valor de  $\beta n_\beta$  de 0.46 para una concentración de amitrol  $5.00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ .

A la vista de estos resultados, podemos concluir que el proceso de oxidación de amitrol en un electrodo de "glassy carbon" es irreversible, con pérdida de un electrón en la etapa limitante de la velocidad.

Del valor de la pendiente de las rectas obtenidas en el estudio de la influencia del pH por voltamperometría cíclica, (pág 180), puede deducirse el número de protones intercambiados en el proceso electrodo, haciendo uso de la siguiente expresión<sup>120,126</sup>:

$$m = -\frac{0.059}{\beta n_{\beta}} P \quad (42)$$

donde,  $m$  representa la pendiente de la recta obtenida y  $P$  el número de protones intercambiados.

El valor de la pendiente de la representación gráfica del potencial de pico frente al pH obtenido fue de -104 mV para valores de pH inferiores a 8.0. Tomando como valor de  $\beta n_{\beta}$  el obtenido en los estudios en régimen no estacionario ( $\beta n_{\beta}=0.46$ ), se estima que el número de protones intercambiados en el proceso es de 0.8, es decir de un protón.

## **B. Identificación de los productos de la electrolisis.**

Con el objetivo de identificar los productos resultantes de la oxidación electroquímica del amitrol, se procede a la realización de diferentes experimentos sobre las disoluciones resultantes de los estudios coulombimétricos. Para ello se emplea la espectroscopía de infrarrojos y la espectroscopía de absorción molecular.

Al mismo tiempo y dado que durante la realización de la electrolisis se observa la aparición de burbujas, indicando la generación de un gas durante el proceso electroquímico, se realiza un ensayo cualitativo con el objetivo de identificar CO<sub>2</sub>.

### **B.1 Estudios empleando espectroscopía de absorción infrarroja**

Para la realización de este estudio se liofilizan las disoluciones resultantes de algunas de las electrolisis realizadas. En todos los casos la cantidad de amitrol electrolizada es de  $1.00 \times 10^{-5}$  moles. Posteriormente, el resultado de la liofilización se trata con 1.0 mL de cloroformo, se microfiltra y se registran los espectros de IR.

En la figura 81 se muestra el espectro de IR obtenido para una de las electrolisis realizadas junto el espectro de IR del amitrol.

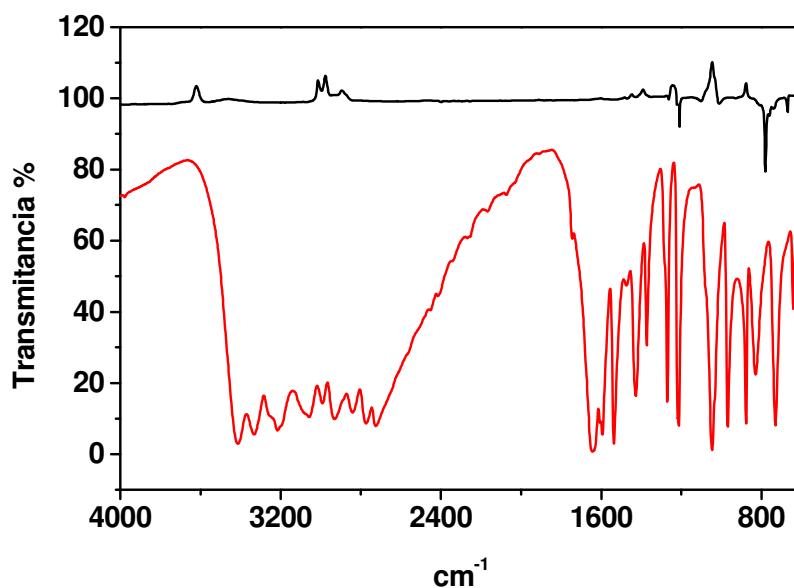


Figura 81.- Espectros de IR de amitrol (—) y de la disolución resultante de la electrolisis (—).

Como se observa en el espectro y a pesar de la preconcentración, no se observan bandas de absorción en el IR en ninguno de los espectros realizados a las disoluciones procedentes de las diferentes electrolisis. Ésto confirma la electrolisis total del amitrol puesto en disolución; aunque no permite la identificación de los productos de la oxidación de amitrol, si parece indicar que no hay presencia de productos en esas disoluciones.

## B.2 Identificación y determinación de amonio

Son varios los trabajos bibliográficos en los cuales se ha identificado el ión amonio como producto de degradación de amitrol, bien por oxidación anódica<sup>129</sup> o por la irradiación con luz UV-Visible en presencia de un catalizador<sup>69,130</sup>. Es por ello que se ha procedido a la identificación del ión amonio en las disoluciones procedentes de los estudios coulombimétricos.

Para la identificación y determinación del ión amonio se ha utilizado un ensayo espectrofotométrico empleando el reactivo de Nessler<sup>131</sup>. Dicho reactivo en presencia de amoniaco se descompone formando yoduro de dimercuriamonio, de color amarillo, que permite la determinación de los iones amonio.

En un primer lugar se procede a realizar un análisis cualitativo, para ello se toman tres tubos de ensayo: uno para el blanco y dos para las muestras, con 10 mL de agua destilada y 10 mL de la muestra de electrolisis previamente alcalinizada con hidróxido sódico, respectivamente. A continuación se añaden 100  $\mu\text{L}$  del reactivo de Nessler, observándose la aparición de color amarillo en los tubos de muestra, lo que es indicativo de la presencia de iones amonio en las disoluciones procedentes de la electrolisis.

Una vez identificada la presencia de iones amonio, se procede a la determinación de los mismos, para ello se emplea el método del patrón externo. Se preparan seis disoluciones patrón de cloruro amónico en concentraciones comprendidas entre 0 y 2.0  $\text{mg L}^{-1}$ . A 10 mL de cada una de estas disoluciones se les añade 500  $\mu\text{L}$  del reactivo de Nessler, y se mide su absorbancia a 425 nm, frente al blanco. Se representa la absorbancia frente a la concentración del patrón resultando un ajuste lineal con ecuación:

$$\text{Abs} = (0.000 \pm 0.003) + (0.106 \pm 0.004) C \text{ (mg L}^{-1}\text{)}, r = 0.996, n = 6.$$

De la misma forma, se toma 1.0 mL de la disolución procedente de la electrolisis, se diluye a 10 mL con agua destilada, se alcaliniza con hidróxido sódico y se le añaden 500  $\mu\text{L}$  del reactivo, midiendo su absorbancia a 425 nm frente al blanco. Se obtiene una concentración de iones amonio en la disolución de electrolisis de  $(10 \pm 1) \text{ mg L}^{-1}$  ( $n=4$ ). Esta concentración equivale a 155  $\mu\text{g}$  de nitrógeno, lo que se corresponde con un 25 % del nitrógeno puesto en disolución en la electrolisis, lo que parece indicar la pérdida del radical amino del amitrol.

### **B.3 Identificación de $\text{CO}_2$**

En muchos estudios bibliográficos se ha identificado al  $\text{CO}_2$  como uno de los productos de degradación del amitrol<sup>15-21,70,120,130</sup>. Como ya se ha dicho anteriormente, durante los estudios coulombimétricos se ha observado claramente la generación de burbujas en la superficie del electrodo, hecho que indica la generación de un gas o gases en el proceso global de oxidación del amitrol. Con el objetivo de comprobar si se trata de  $\text{CO}_2$  se procede a realizar un ensayo de identificación con fenolftaleína<sup>132</sup>.

Para ello, antes de comenzar la electrolisis, se cubre la celda con un papel de filtro al que se le añaden unas gotas de hidróxido sódico y de una solución alcohólica de fenolftaleína al 1%, produciéndose la coloración rosada del indicador. Al mismo tiempo, como

muestra control, a otro papel se le adiciona la misma cantidad de los reactivos y se deja al aire.

Al cabo de los diez minutos de iniciada la electrolisis, el color de la fenolftaleína del papel colocado en la celda vira a incoloro, mientras el color del papel control permanece invariable. Por lo tanto, todo parece indicar que se genera  $\text{CO}_2$  durante el proceso electródico.

### **C. Propuesta del mecanismo electródico**

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los estudios electroquímicos y de identificación realizados, junto con estudios bibliográficos de amitrol, se propone el mecanismo de oxidación en medio ácido fosfórico  $0.026 \text{ mol L}^{-1}$  mostrado en la figura 82.

En un primer paso, el amitrol es oxidado a un radical con la pérdida de un electrón y un protón, éste parece ser el paso limitante de la velocidad del proceso, como ha quedado demostrado en esta Memoria. Este radical podría hidrolizarse y oxidarse para dar lugar a especie/s intermedia/s, y finalmente  $\text{CO}_2$ ,  $\text{NH}_4^+$  y otros productos no identificados con los estudios realizados. Esta/s especie/s intermedia/s, no son estables en el proceso global de oxidación y posiblemente son la/s responsables de la presencia del par redox Red3/Ox3. Como posibles especies intermedias podrían encontrarse: 5-hidroxi-amitrol, 3-hidroxitriazol y/o urazol; todas ellas han sido identificadas como productos de degradación de amitrol en suelos, plantas de manzano<sup>70</sup> así como en agua, después de someterla a procesos de descontaminación por irradiación con luz UV-Visible en presencia de complejos de hierro (III)<sup>69</sup>. El urazol como se observa en la figura 35 (pág 122), se oxida más fácilmente en el electrodo de "glassy carbon" que el propio amitrol, por lo tanto, a los potenciales utilizados en las coulombimetrías, (1100-1400 mV), se habría oxidado lo que justificaría que no haya sido identificado en nuestros estudios.

Por otro lado, el radical generado en el primer paso, puede ser adsorbido en la superficie del electrodo y dar lugar a la formación de polímeros. Este hecho explicaría que a altas concentraciones de amitrol, las electrolisis se paren, como consecuencia del bloqueo del electrodo por la formación de un polímero. A bajas concentraciones de amitrol, la formación del polímero no parece ser significativa.

En la bibliografía se han descrito pasos de oxidación similares para la anilina y otras aminas aromáticas<sup>133-136</sup>. La oxidación de amitrol a radical, por pérdida de un protón y un electrón, ha sido propuesta por **Plimmer y col.** como mecanismo de degradación de amitrol en suelos<sup>19</sup> y como mecanismo de acción del herbicida en las plantas<sup>137</sup>. Además, **Kertit y col.**<sup>138</sup> generan un polímero a partir de amitrol sobre un electrodo de cobre. En su estudio proponen como paso previo a la polimerización la formación del radical.

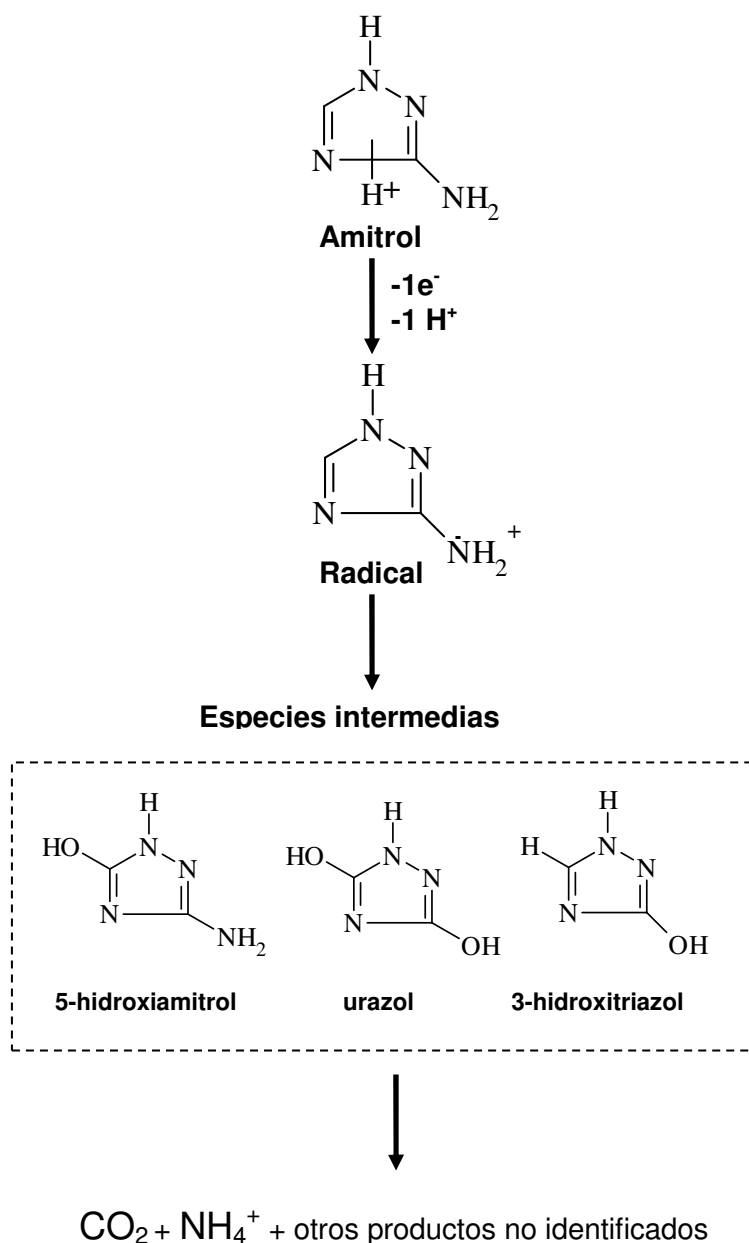


Figura 82.- Propuesta de mecanismo electródico de oxidación de amitrol.



### **5.1.6 DETERMINACIÓN DE AMITROL EN AGUA DE RÍO POR VOLTAMPEROMETRÍA DE BARRIDO LINEAL (LSV)**

En el estudio de la influencia de la concentración de amitrol en régimen no estacionario, descrito anteriormente (pág 193), se ha mostrado que la intensidad de pico de amitrol, en medio ácido fosfórico  $0.026 \text{ mol L}^{-1}$  es una función lineal de la concentración. Para una velocidad de barrido de  $50 \text{ mV s}^{-1}$  se alcanza una sensibilidad de  $4.2 \times 10^4 \mu\text{A L mol}^{-1}$ , con un límite de detección de  $1.1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ .

Con el fin de disminuir el límite de detección del método, se procede a poner a punto un procedimiento de preconcentración de amitrol empleando la técnica de extracción en fase sólida (SPE) con formación de par iónico (IP-SPE)

La SPE es una técnica en la cual una muestra líquida se hace pasar a través de un sólido poroso particulado, en cuya superficie se producirá la retención del analito/os de interés, mediante diferentes mecanismos: fase inversa, fase normal e intercambio iónico. Posteriormente, los analitos retenidos se eluyen mediante el paso de un volumen de un disolvente adecuado. El principio en el cual se basa la SPE es la diferente afinidad de los analitos entre la fase sólida que es el adsorbente y al fase líquida que es la muestra<sup>139</sup>.

La naturaleza química de los adsorbentes empleados en SPE es similar a los utilizados en cromatografía de líquidos. Existen diferentes tipos de adsorbentes que se comercializan en forma de cartuchos o discos y que se eligen en función de la naturaleza de los analitos que se quieran extraer. Se pueden diferenciar básicamente tres tipos, los adsorbentes de sílice enlazados<sup>140</sup>, los de carbón<sup>141</sup> y los poliméricos<sup>142</sup>. Recientemente se han desarrollado otros adsorbentes como son los inmunosorbentes y los polímeros de impresión molecular<sup>143</sup>.

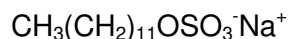
La SPE se emplea como técnica de preconcentración, cuando es el analito de interés el que queda retenido en el adsorbente y posteriormente es eluido con un pequeño volumen de disolvente adecuado, o bien como técnica de limpieza, cuando los que quedan retenidos en el adsorbente son los interferentes de la muestra.

La multitud de ventajas que presenta la SPE, entre ellas: alta reproducibilidad, fácil uso, bajo consumo de disolventes orgánicos, fácil acoplamiento a otras técnicas y automatización, así como la gran variedad de condiciones de extracción y preconcentración

disponibles; han hecho que el uso de esta técnica de tratamiento de muestra esté altamente extendido y sea empleada en muchos métodos oficiales<sup>144-147</sup>.

En esta Memoria se ha empleado la SPE de las dos formas posibles, como técnica de preconcentración, en este apartado, y como técnica de limpieza en la puesta a punto de la metodología analítica para la determinación de amitrol y urazol en muestras de manzana por electroforesis capilar, descrita en el capítulo anterior.

El amitrol es un compuesto altamente polar, y por lo tanto, presenta muy baja retención en los cartuchos de fase inversa utilizados en SPE<sup>48</sup>. Con el objetivo de aumentar su retención en un cartucho C<sub>18</sub> se ha utilizado la formación de un par iónico. Para ello, antes de hacer pasar el herbicida a través del cartucho, se le hace interaccionar con un reactivo de par iónico (IP), en este caso el dodecil sulfato sódico (SDS) cuya estructura química es:



Los reactivos formadores de pares iónicos, generalmente contienen en su estructura una porción no polar, como una cadena hidrocarbonada, y una porción polar como un ácido o una base. La porción polar del reactivo interacciona electrostáticamente con el analito, que debe encontrarse cargado para formar el llamado "par iónico". La porción no polar interacciona con el adsorbente de fase inversa.

El reactivo formador de par iónico se añade a la muestra antes de ser pasada a través del cartucho de SPE para formar un par iónico con el analito. Posteriormente, se hace pasar la muestra a través del cartucho activado, quedando retenido el par iónico formado. Por último el analito se eluye con el disolvente adecuado.

El uso de reactivos formadores de par iónico en SPE (IP-SPE) ha sido empleado en el análisis de diferentes compuestos y en varios campos, como el farmacéutico, medioambiental y en el control y análisis de alimentos<sup>148-152</sup>. Generalmente, la IP-SPE se ha empleado en extracción en fase inversa utilizando cartuchos C<sub>18</sub>, fenil, ciclohexil y poliméricos, con analitos muy polares y en muestras acuosas<sup>148</sup>. En el campo de los herbicidas se ha empleado en la determinación de compuestos de amonio cuaternario como el paraquat<sup>153-156</sup>.

## **A. Influencia de la presencia de dodecil sulfato sódico en el medio de medida en la señal anódica del amitrol**

Debido a que emplearemos dodecil sulfato sódico en el procedimiento de preconcentración, se realiza en primer lugar un estudio de la influencia del surfactante aniónico en la señal voltamperométrica del amitrol. En la bibliografía, existen estudios que muestran que la presencia de medios micelares en el medio de medida puede modificar el comportamiento electroquímico del analito en estudio<sup>157-163</sup>.

Los surfactantes han sido ampliamente utilizados en electroquímica y en el campo del electroanálisis con el fin de modificar las propiedades eléctricas de la interfase electrodo-disolución y el proceso electródico<sup>157,158</sup>. La adsorción de los surfactantes a la superficie del electrodo y la solubilización de las sustancias electroactivas en los agregados micelares pueden variar significativamente el potencial redox, los coeficientes de transferencia de carga, los coeficientes de difusión y las constantes de velocidad del proceso electroquímico, además de variar la estabilidad de los intermedios y productos del proceso electródico<sup>159-163</sup>.

### **A. 1 Influencia de la concentración del surfactante**

Para estudiar la influencia de la presencia de SDS en la señal anódica de amitrol, se preparan disoluciones de amitrol  $5.00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  en medio ácido fosfórico  $0.026 \text{ mol L}^{-1}$  en presencia de diferentes concentraciones del surfactante. Se registran barridos anódicos entre 500 y 1600 mV a una velocidad de barrido de  $50 \text{ mV s}^{-1}$  sobre cada una de las disoluciones preparadas.

En la figura 83 se muestran los voltamperogramas de barrido lineal obtenidos para las diferentes concentraciones de SDS.

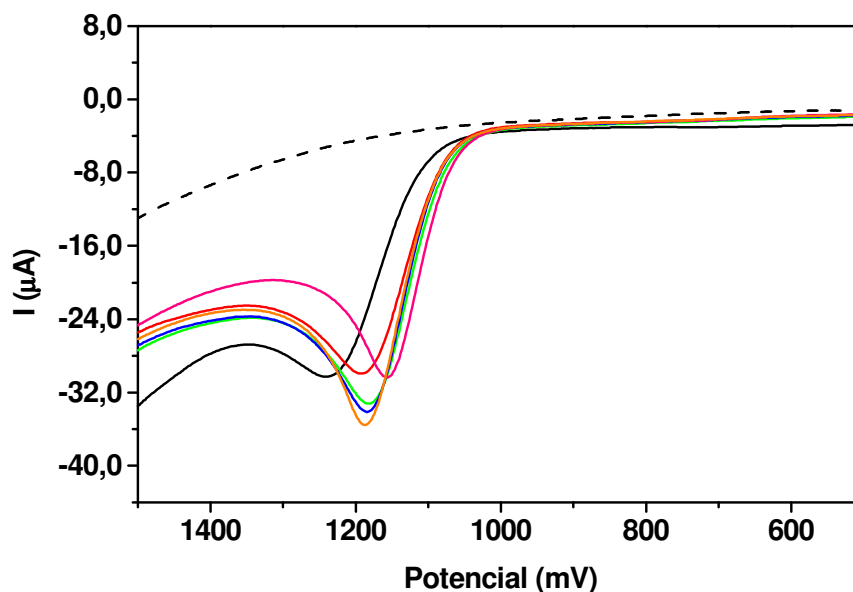


Figura 83.- Influencia de la concentración de SDS: 0 (—),  $1.0 \times 10^{-4}$  (—),  $4.0 \times 10^{-4}$  (—),  $1.0 \times 10^{-3}$  (—),  $4.0 \times 10^{-3}$  (—),  $6.0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> (—), en la señal anódica de amitrol en concentración de amitrol  $5.00 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> en medio ácido fosfórico 0.026 mol L<sup>-1</sup>. Voltamperograma obtenido en disolución de ácido fosfórico en presencia de SDS en concentración  $4.00 \times 10^{-3}$  en línea discontinua. Velocidad de barrido 50 mV s<sup>-1</sup>.

Puede observarse, que la presencia del surfactante modifica tanto el potencial de pico como la intensidad del pico de la señal anódica del amitrol. No se observan picos en el voltamperograma de la disolución que contiene únicamente SDS.

En la figura 84 se representa la evolución del potencial de pico y de la intensidad de pico con la concentración de SDS. El potencial de pico se desplaza a valores menos positivos (oxidación favorecida) y la intensidad de pico se ve incrementada hasta alcanzar un valor máximo para una concentración de SDS de  $4.0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>, disminuyendo para concentraciones mayores del surfactante.

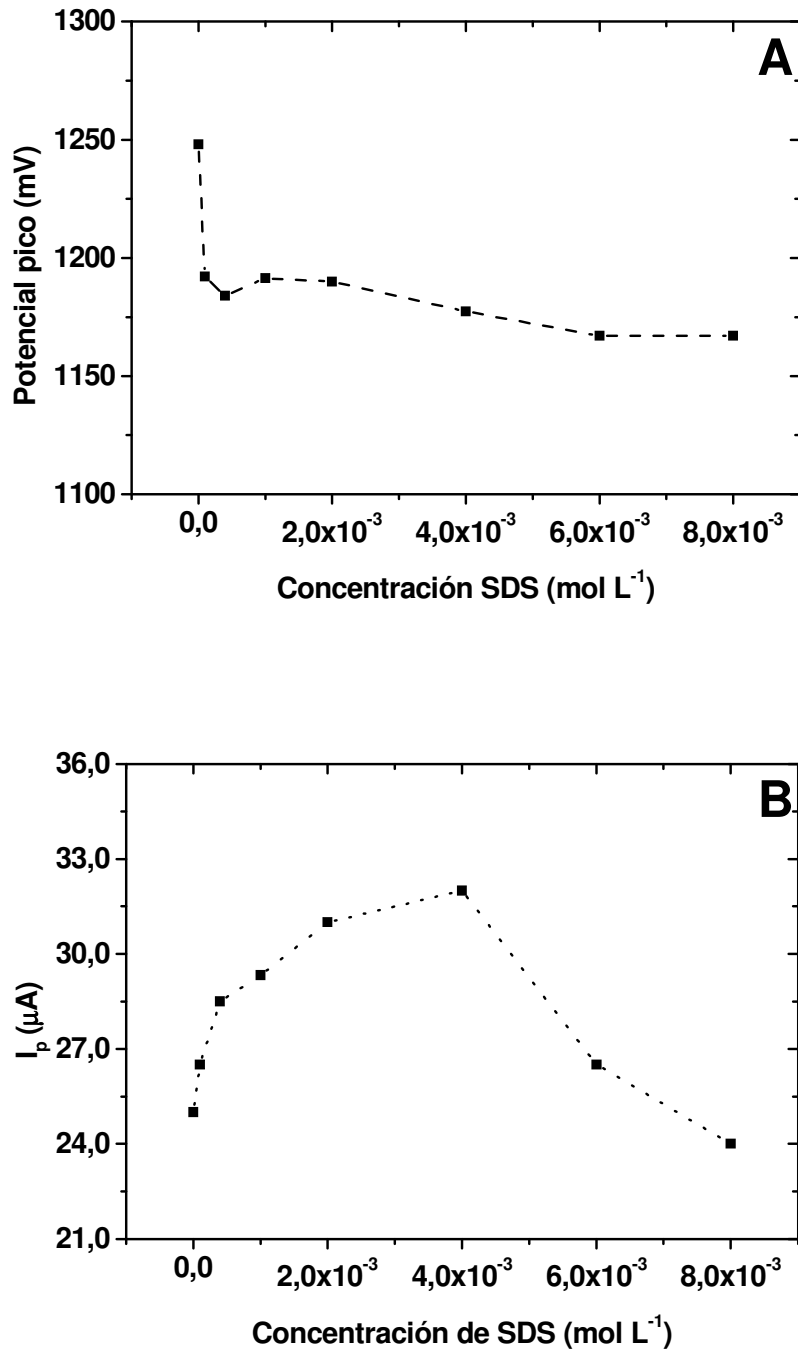


Figura 84.- Evolución del potencial de pico (A) e intensidad de pico (B) con la concentración de SDS. Condiciones iguales que en figura 83.

Este hecho, indica que el proceso redox (Ox1) del amitrol, se facilita por la adición del surfactante aniónico a la disolución.

El comportamiento observado, puede justificarse teniendo en cuenta que el SDS puede adsorberse en la superficie del electrodo vía interacciones hidrofóbicas por su porción apolar, formando de esta forma en la superficie del electrodo un film hidrofílico cargado negativamente. En el electrolito soporte utilizado, ácido fosfórico  $0.026 \text{ mol L}^{-1}$  (pH = 2.0) el amitrol se encuentra cargado positivamente y puede interactuar electrostáticamente con la capa de SDS adsorbida en la superficie del electrodo. Esta interacción reduce el sobrevoltaje de la reacción en el electrodo y acelera la velocidad de la transferencia electrónica.

La ligera disminución de la intensidad de pico a altas concentraciones de SDS, puede atribuirse a una disminución del coeficiente de difusión del analito, como consecuencia del enlace formado entre éste y las micelas aniónicas presentes en la disolución una vez que la superficie del electrodo se encuentra recubierta. Se han observado comportamientos similares en estudios electroquímicos de otros compuestos como la dopamina y la adrenalina<sup>163,164</sup>.

Se realiza el mismo estudio para otras tres concentraciones de amitrol,  $4.00 \times 10^{-5}$ ,  $1.00 \times 10^{-4}$  y  $1.00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ .

En la figura 85 se muestra la evolución de la intensidad de pico con la concentración de SDS a las cuatro concentraciones de amitrol estudiadas.

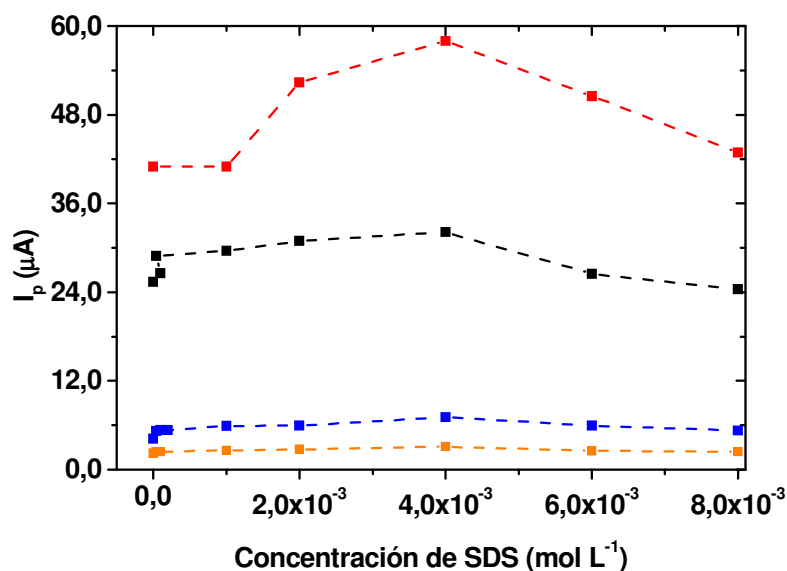


Figura 85.-Influencia de la concentración de SDS en la señal anódica de amitrol a cuatro concentraciones:  $4.00 \times 10^{-5}$  (■),  $1.00 \times 10^{-4}$  (■),  $5.00 \times 10^{-4}$  (■) y  $1.00 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> (■). Resto de condiciones igual que en figura 83.

En todos los casos se observa un comportamiento similar, tanto en la intensidad de pico como en el potencial de pico con la concentración de SDS. Se alcanza un máximo de intensidad de pico para una concentración de SDS de  $4.0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>.

## A.2 Modificación de la superficie del electrodo

Con el fin de comprobar la posible modificación de la superficie del electrodo de "glassy carbon" en presencia del surfactante aniónico, se procede a sumergir el electrodo en una disolución agitada de SDS en concentración  $4.0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> durante diferentes periodos de tiempos: 5, 10 y 20 minutos. Posteriormente el electrodo se saca de esta disolución, se lava y se sumerge en una disolución de amitrol,  $1.00 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>, en ácido fosfórico  $0.026$  mol L<sup>-1</sup>, registrándose un barrido anódico para comprobar si existe diferencia alguna en la señal anódica de oxidación del herbicida.

En la figura 86 se muestran los voltamperogramas obtenidos, junto con el voltamperograma de amitrol obtenido sin haber sumergido al electrodo previamente en la disolución del surfactante. Puede observarse que la superficie del electrodo se ve modificada

de alguna forma en presencia del SDS dando lugar a una mejora en la señal analítica del amitrol, desplazándose el potencial de pico a valores menos positivos y aumentando ligeramente la intensidad de pico. Este incremento es más acusado con el tiempo de modificación de la superficie del electrodo.

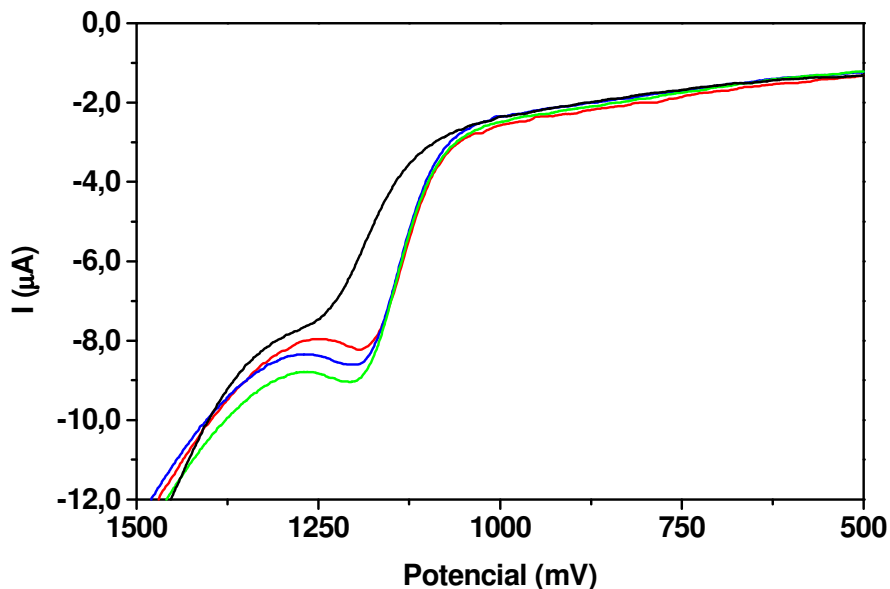


Figura 86-. Voltamperogramas de barrido lineal obtenidos en una disolución de amitrol  $1.00 \times 10^{-4}$  mol  $\text{L}^{-1}$  con un electrodo de “glassy carbon” sin modificar (—) y modificado introduciéndolo en una disolución agitada de SDS en concentración  $4.0 \times 10^{-3}$  mol  $\text{L}^{-1}$  a diferentes tiempos: 5 (—), 10 (—) y 20 min (—). Velocidad de barrido:  $50 \text{ mV s}^{-1}$ .

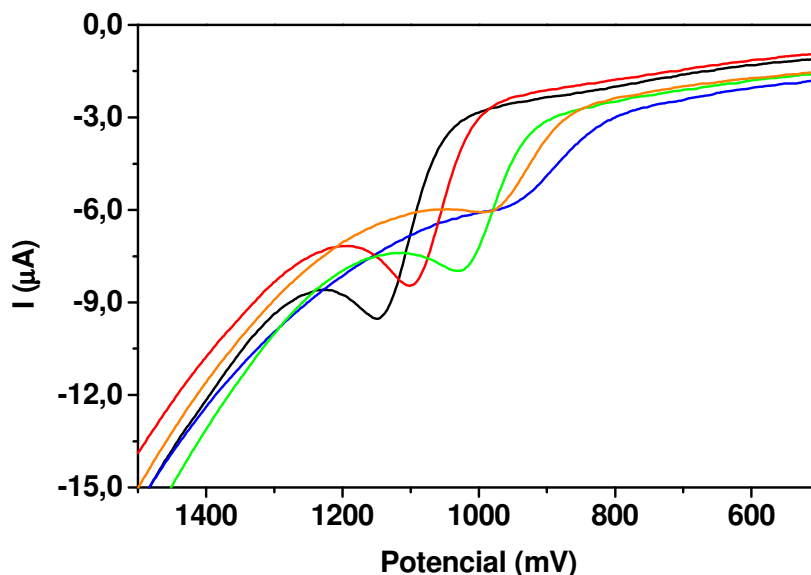
A la vista de estos resultados, se puede concluir que la presencia de SDS en la disolución produce una modificación en la superficie del electrodo de “glassy carbon” que facilita la transferencia electrónica del amitrol y mejora su respuesta electroquímica.

### A. 3 Influencia del pH del medio de medida

El estudio se realiza con disoluciones de amitrol en concentración  $1.00 \times 10^{-4}$  mol  $\text{L}^{-1}$  en medio ácido fosfórico  $0.026 \text{ mol L}^{-1}$ , y en presencia de SDS en concentración  $4.0 \times 10^{-3}$  mol  $\text{L}^{-1}$ , ajustado a diferentes valores de pH con hidróxido sódico. Para ello se registran los barridos anódicos entre 500 y 1500 mV a una velocidad de barrido de  $50 \text{ mV s}^{-1}$ .



En la figura 87 se muestran los voltamperogramas obtenidos a diferentes valores de pH comprendidos entre 2.0 y 6.5.



**Figura 87.- Influencia del pH: 2.0 (—), 2.6 (—), 3.6 (—), 5.0 (—) y 6.5 (—).** Concentración de amitrol  $1.00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  en medio ácido fosfórico  $0.026 \text{ mol L}^{-1}$ , SDS en concentración  $4.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  Velocidad de barrido:  $50 \text{ mV s}^{-1}$ .

Tanto la intensidad de pico como el potencial de pico de la señal de oxidación de amitrol disminuyen su valor con el aumento del pH (figura 88). En el caso del potencial, mostrando una variación lineal con pendiente  $-61 \text{ mV pH}^{-1}$  ( $r = 0.990$ ,  $n=6$ ) para valores de pH comprendidos entre 2.0 y 4.0 y con pendiente  $-23 \text{ mV pH}^{-1}$  ( $r = 0.998$ ,  $n=3$ ) para valores de pH comprendidos entre 4.0 y 6.5. El punto de corte de las dos rectas ( $\text{pH} = 3.8$ ) está próximo al  $\text{pK}_2$  del compuesto.

La disminución de la intensidad de pico con el pH, puede justificarse teniendo en cuenta el diagrama de fracciones molares de amitrol mostrado en la figura 9 (pág 68) de esta Memoria. El amitrol se encuentra cargado positivamente a pH ácidos. Al aumentar el pH, la especie predominante del amitrol es la especie neutra que no interacciona con el SDS y la intensidad de pico por tanto se ve disminuida.

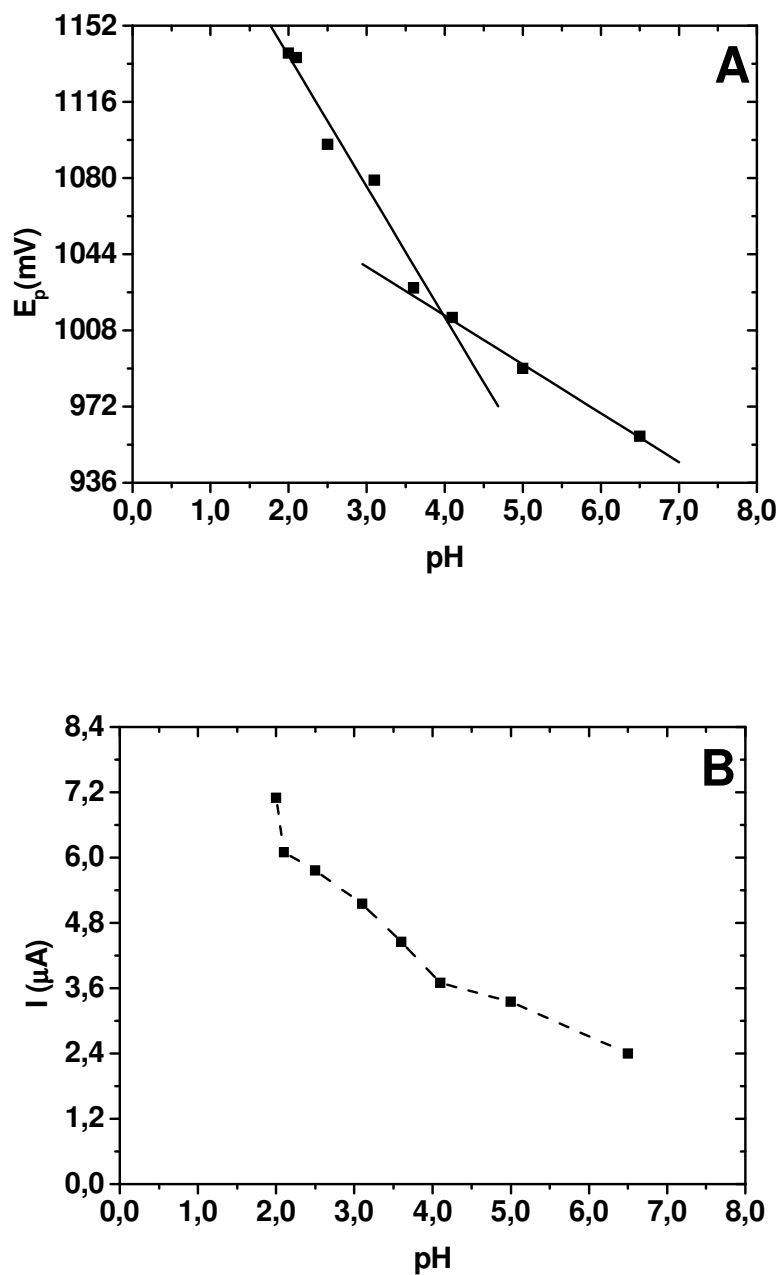


Figura 88.- Influencia del pH en el potencial de pico (A) e intensidad de pico (B) para una disolución de amitrol  $1.00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  en medio ácido fosfórico  $0.026 \text{ mol L}^{-1}$  en presencia de SDS en concentración  $4.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ . Resto de condiciones igual que en figura 87.

#### A. 4 Elección de la técnica voltamperométrica de medida

Con objeto de elegir la técnica electroanalítica más sensible para la determinación de amitrol y teniendo en cuenta la mayor sensibilidad de las técnicas impulsionales, se procede a realizar un estudio de la concentración de amitrol en medio ácido fosfórico  $0.026 \text{ mol L}^{-1}$  en presencia de SDS en concentración  $4.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  a  $\text{pH} = 2.0$ , por voltamperometría de barrido lineal (LSV) y por voltamperometría diferencial de impulsos (DPV).

##### A.4.1 Influencia de la concentración de amitrol por voltamperometría de barrido lineal.

Se estudia la influencia de la concentración de amitrol para un rango de concentraciones del herbicida comprendido entre  $1.00 \times 10^{-5}$  y  $8.00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  registrando barridos anódicos entre 500 y 1500 mV a una velocidad de barrido de  $50 \text{ mV s}^{-1}$ .

En la figura 89 se muestran algunos de los voltamperogramas obtenidos junto con la evolución de la intensidad de pico de la señal anódica de amitrol con la concentración.

Como puede observarse en la misma figura, la intensidad de pico muestra una variación lineal en todo el intervalo de concentraciones estudiado con ecuación de regresión:

$$I_p (\mu\text{A}) = (0.7 \pm 0.2) + (5.7 \pm 0.1) \times 10^4 C (\text{mol L}^{-1}), r=0.9997 \text{ n}=9.$$

La pendiente es mayor que la obtenida en ácido fosfórico  $0.026 \text{ mol L}^{-1}$  sin surfactante (pág 193), cuyo valor es  $4.2 \times 10^4 \mu\text{A L mol}^{-1}$ , por lo que la presencia de SDS en el electrolito soporte, proporciona una mayor sensibilidad en la medida electroanalítica de amitrol por voltamperometría de barrido lineal utilizando un electrodo de "glassy carbon".

Los límites de detección y determinación se calculan a partir de la desviación estándar de la señal del blanco, medida al potencial de pico<sup>83</sup>. Para diez repeticiones de un blanco de electrolito, ácido fosfórico  $0.026 \text{ mol L}^{-1}$ , en presencia de SDS en concentración  $4.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , a una velocidad de barrido de  $50 \text{ mV s}^{-1}$ , se obtiene un límite de detección de  $5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  ( $0.4 \text{ mg L}^{-1}$ ) y un límite de determinación de  $1.5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  ( $1.3 \text{ mg L}^{-1}$ ).

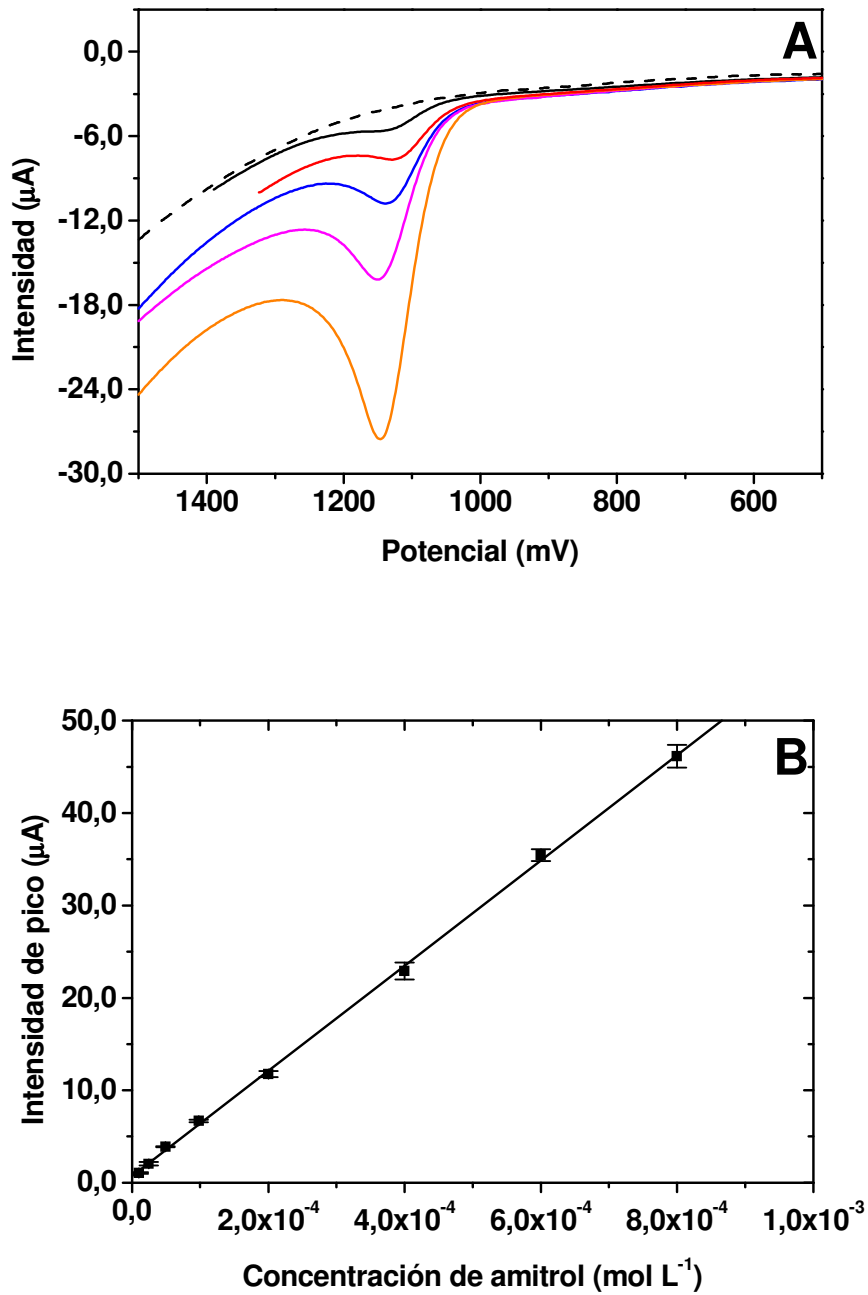


Figura 89.-Voltamperogramas de barrido lineal obtenidos a diferentes concentraciones de amitrol (A): 0 (discontinua),  $2,40 \times 10^{-5}$  (—),  $4,90 \times 10^{-5}$  (—),  $9,50 \times 10^{-5}$  (—),  $2,00 \times 10^{-4}$  (—) y  $4,00 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>(—). Evolución de la intensidad de pico con la concentración de amitrol (B). Medio de medida: ácido fosfórico 0.026 mol L<sup>-1</sup> en presencia de SDS en concentración  $4,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>. Velocidad de barrido: 50 mV s<sup>-1</sup>. Se incluye desviación estándar de cada punto (n=3).

#### A.4.2 Influencia de la concentración de amitrol por voltamperometría diferencial de impulsos

Antes de realizar este estudio, se procede a la elección de las variables instrumentales óptimas de medida. Se realizan estudios de la influencia de la amplitud del impulso y de la velocidad de barrido, sobre la señal anódica de amitrol, empleando para ello disoluciones de amitrol en concentración  $1.00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ .

Para el estudio de la influencia de la amplitud del impulso, se registran barridos entre un potencial inicial de 0 mV hasta un potencial final de 1600 mV a una velocidad de barrido de  $20 \text{ mV s}^{-1}$ .

Se obtiene una variación lineal de la intensidad de pico con la amplitud del impulso para valores de amplitud menores de 75 mV, como puede observarse en la figura 90.

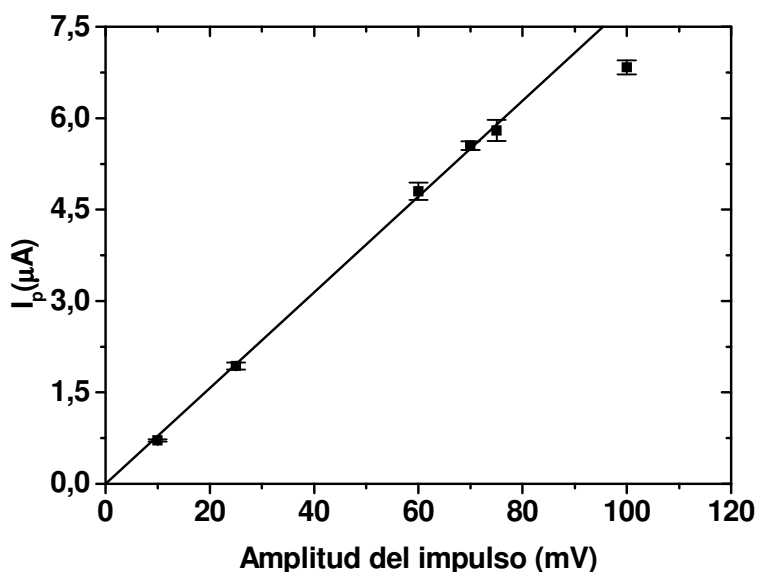


Figura 90.- Evolución de la intensidad de pico con la amplitud del impulso para una concentración de amitrol de  $1.00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ . Potencial inicial: 0 mV, potencial final 1600 mV, velocidad de barrido:  $20 \text{ mVs}^{-1}$ , anchura del impulso: 50 ms, periodo del impulso: 200 ms.

A la vista de los resultados obtenidos, se elige 70 mV como amplitud de impulso óptima.

El estudio de la velocidad de barrido se realiza registrando barridos entre 0 y 1600 mV con una amplitud de impulso de 70 mV, con anchura y periodo de pulso de 50 y 200 ms, respectivamente. La tabla 37 muestra los resultados obtenidos.

Tabla 37.- Influencia de la velocidad de barrido en la señal anódica de amitrol.

<b>v (mV s<sup>-1</sup>)</b>	<b>I<sub>p</sub> (μA)</b>	<b>Anchura de pico (mV)</b>	<b>Relación señal/ruido</b>
5	3.3	97	0.94
10	4.5	90	1.1
15	5.1	91	1.1
20	5.7	90	1.1
25	5.6	90	1.1

Resultados obtenidos de la media de tres análisis.

En vista de los resultados anteriormente descritos se elige 20 mV s<sup>-1</sup> como velocidad de barrido óptima para la realización del estudio de la influencia de la concentración de amitrol.

Este estudio, se realiza con disoluciones de amitrol en concentración comprendida entre 1.00 x 10<sup>-5</sup> y 7.50 x 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup>, registrando barridos anódicos entre 500 y 1500 mV.

En la figura 91 se muestran algunos de los voltamperogramas obtenidos así como la evolución de la intensidad de pico con la concentración del herbicida.

La intensidad de pico varía linealmente con la concentración de amitrol en todo el intervalo de concentraciones estudiado. La ecuación de regresión es:

$$I_p (\mu A) = (0.2 \pm 0.1) + (4.45 \pm 0.05) \times 10^4 C (\text{mol L}^{-1}), r=0.9995 \text{ n}=12.$$

Los límites de detección y determinación se calculan de la misma forma que en LSV<sup>83</sup>. Para diez repeticiones de un blanco de electrolito ácido fosfórico 0.026 mol L<sup>-1</sup> en presencia de SDS en concentración 4.0 x 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup>, con una amplitud de impulso de 70 mV y una velocidad de barrido de 20 mV s<sup>-1</sup>, se obtiene un límite de detección de 7 x 10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup> (0.6 mg L<sup>-1</sup>) y un límite de determinación de 1.9 x 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup> (1.6 mg L<sup>-1</sup>).

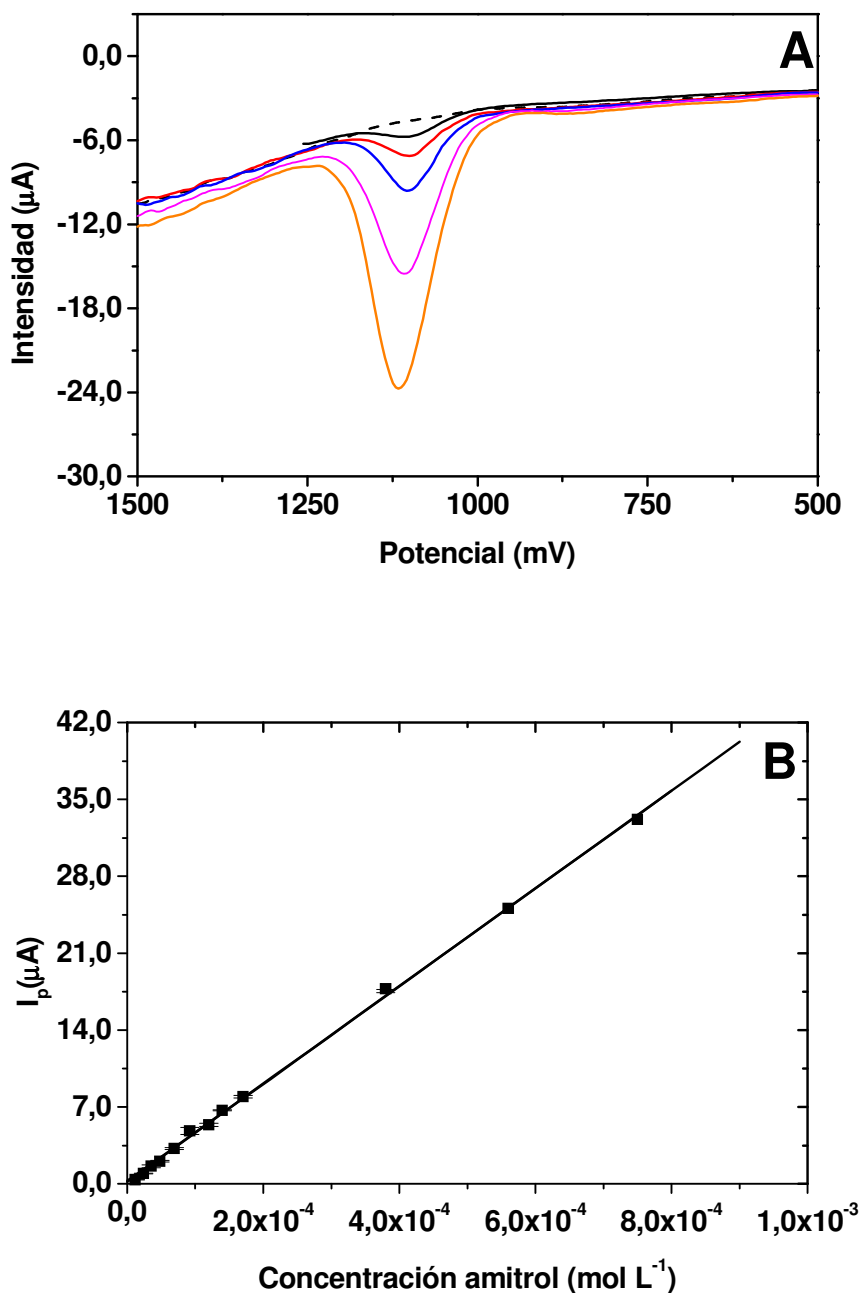


Figura 91.-Voltamperogramas diferencial de impulso obtenidos a diferentes concentraciones de amitrol (A): 0 (discontinua),  $2.40 \times 10^{-5}$  (—),  $4.90 \times 10^{-5}$  (—),  $9.50 \times 10^{-5}$  (—),  $1.90 \times 10^{-4}$  (—) y  $4.00 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> (—). Evolución de la intensidad de pico con la concentración de amitrol (B). Medio de medida: ácido fosfórico 0.026 mol L<sup>-1</sup> en presencia de SDS en concentración  $4.0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>. Amplitud del impulso 70 mV, velocidad de barrido: 20 mV s<sup>-1</sup>. Se incluye la desviación estándar de los puntos (n=3).

Bajo las condiciones experimentales de los estudios realizados, se obtiene una mayor sensibilidad y unos menores límites de detección y determinación, empleando la voltamperometría de barrido lineal. Por tanto, se elige esta técnica de medida para posteriores estudios.

## **B. Optimización del proceso de preconcentración de amitrol en muestras de agua**

Una vez comprobada la influencia de la presencia de SDS en la señal anódica de amitrol, se procede a la puesta a punto del método de preconcentración por extracción en fase sólida (SPE) empleando un cartucho C<sub>18</sub>, previa formación del par iónico entre el amitrol y el SDS.

En un primer lugar se estudia el proceso de preconcentración con muestras de agua destilada, para su posterior aplicación a muestras de agua del río Alberche.

En el estudio se utiliza el método de adición estándar, calculando en todos los casos el porcentaje de recuperación de amitrol.

Con el fin de comprobar la aplicabilidad del proceso, se pipetea 50.0 mL de agua destilada y se dopa con  $2.4 \times 10^{-7}$  moles de amitrol, se añaden  $1.3 \times 10^{-3}$  moles de ácido fosfórico y  $4.6 \times 10^{-4}$  moles de SDS. En un primer lugar el pH de la muestra se ajusta a 3.5 para facilitar la formación del par iónico, ya que por recomendación del fabricante de los cartuchos empleados en el estudio, se debe trabajar a pH superiores a 3.0.

Una vez preparada, la muestra se hace pasar a través del cartucho C<sub>18</sub>, previamente activado, quedando el par iónico, formado entre el surfactante y el amitrol, retenido en el cartucho. Para la posterior elución del amitrol se utilizan 2.00 mL de tampón fosfato 0.026 mol L<sup>-1</sup> ajustado a pH 11.0, pH al cual el herbicida se encuentra cargado negativamente (véase figura de fracciones molares, figura 9, pág 69), produciéndose una repulsión entre el SDS y el amitrol, ambos cargados negativamente y facilitando así la elución del herbicida.

Una vez obtenido el extracto de la preconcentración, debe ajustarse el pH de medida óptimo (pH 2.0). Para ello sobre los 2.00 mL del extracto se añaden 150 µL ácido fosfórico concentrado. Se registra el voltamperograma de barrido lineal de oxidación entre 500 mV a



1600 mV a  $50 \text{ mV s}^{-1}$ . A continuación se realizan dos adiciones consecutivas de una disolución de concentración conocida de amitrol, registrando el mismo barrido de potencial a cada una de ellas. El porcentaje de recuperación de amitrol se calcula empleando el método de adición estándar.

En la figura 92 A se muestran los voltamperogramas obtenidos. La evolución de la intensidad de pico con el aumento de la concentración de herbicida adicionado se muestra en la figura 92 B. Como puede observarse en la figura, existe una relación lineal entre la intensidad de pico y la concentración adicionada de amitrol, con una sensibilidad de  $(5.7 \pm 0.2) \times 10^4 \mu\text{A L mol}^{-1}$ .

La recuperación obtenida empleando este procedimiento es del 98 %.

La sensibilidad alcanzada es igual a la obtenida en las medidas de amitrol en presencia de SDS, mostrada en la sección anterior. Lo que indicaría que en el proceso de elución de amitrol, parte del SDS presente en la muestra es arrastrado al medio de medida en una concentración tal que se facilita la oxidación del amitrol sin necesidad de adicionar una mayor cantidad del surfactante en la celda de medida.

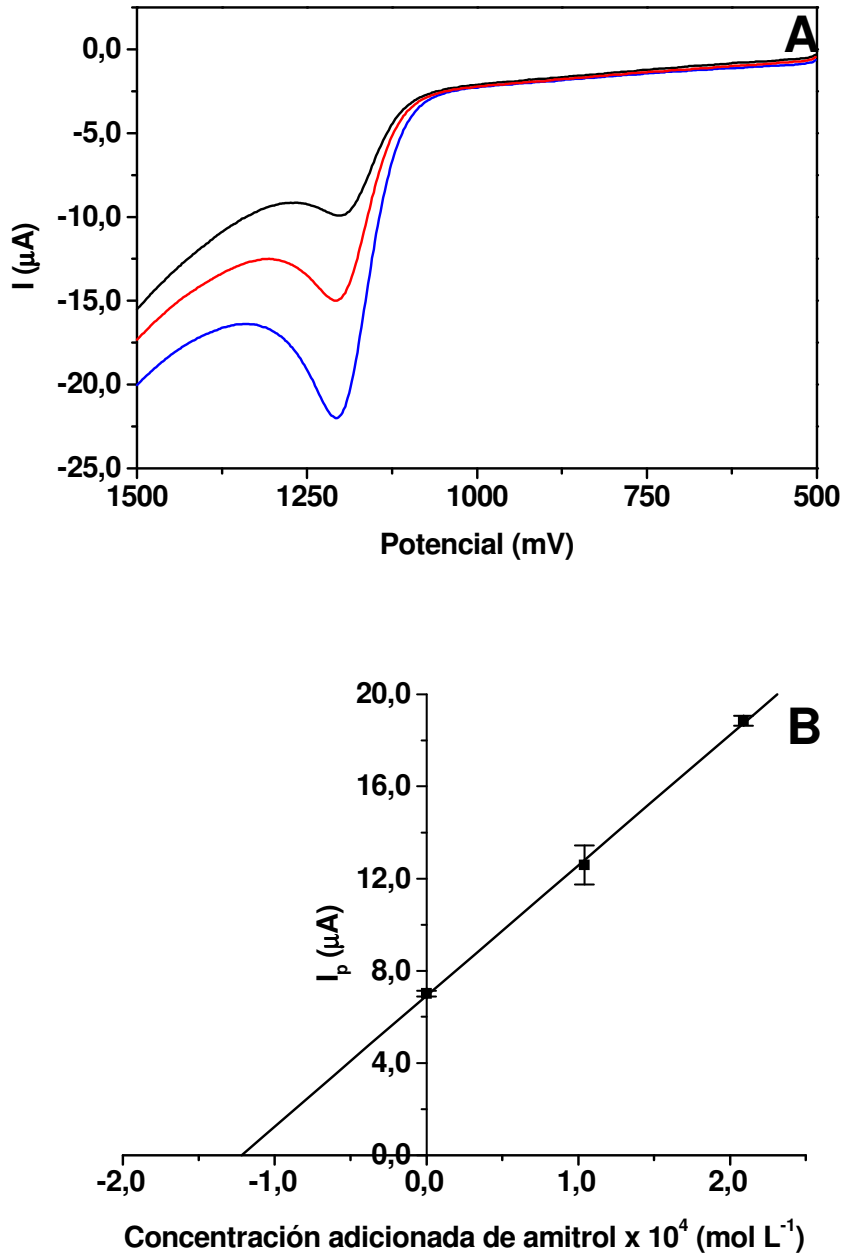


Figura 92.- Voltamperogramas de barrido lineal (A) obtenidos para la muestra una vez sometida al proceso de preconcentración (—) y las dos adiciones de amitrol en concentración  $1.00 \times 10^{-4}$  (—) y  $2.10 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  (—) respectivamente, y evolución de la intensidad de pico con la concentración adicionada de amitrol. (B). Velocidad de barrido  $50 \text{ mV s}^{-1}$ .

### B.1 Influencia de la concentración del surfactante

El estudio de la concentración de SDS en el proceso de preconcentración por IP-SPE, se realiza con muestras de 50.0 mL de agua destilada a las que se les adicionan  $2.4 \times 10^{-7}$  moles de amitrol,  $1.3 \times 10^{-3}$  moles de ácido fosfórico y diferentes cantidades de SDS comprendidas entre  $2.0$  y  $9.2 \times 10^{-4}$  moles, ajustándolas a pH 3.5. Estas muestras se someten al proceso de extracción descrito en el estudio anterior y se evalúa el rendimiento obtenido por el método de adición estándar.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 39, en ella se recogen los valores de la pendiente y la ordenada en el origen de la recta de adición estándar que muestran la evolución de la intensidad de pico con la concentración adicionada de amitrol, junto con el coeficiente de regresión y la recuperación obtenida en la extracción.

Tabla 39.- Influencia de la concentración de SDS en la extracción y preconcentración de amitrol

Moles de SDS	Pendiente	ordenada	r	R %
$2.0 \times 10^{-4}$	$(4.4 \pm 0.1) \times 10^4$	$(5.9 \pm 0.2)$	0.9994	110
	$(4.4 \pm 0.4) \times 10^4$	$(7.1 \pm 0.5)$	0.996	132
<b><math>4.6 \times 10^{-4}</math></b>	<b><math>(5.7 \pm 0.1) \times 10^4</math></b>	<b><math>(6.9 \pm 0.2)</math></b>	<b>0.9996</b>	<b>99</b>
	<b><math>(5.7 \pm 0.1) \times 10^4</math></b>	<b><math>(7.0 \pm 0.4)</math></b>	<b>0.9990</b>	<b>101</b>
$9.2 \times 10^{-4}$	$(5.0 \pm 0.1) \times 10^4$	$(4.5 \pm 0.2)$	0.9997	74
	$(5.1 \pm 0.2) \times 10^4$	$(4.7 \pm 0.2)$	0.9991	76

Pendiente:  $\mu\text{A L mol}^{-1}$ , ordenada en el origen;  $\mu\text{A}$

Las mayores sensibilidades y las mejores recuperaciones se consiguen cuando la cantidad de SDS adicionada a los 50.0 mL de agua es  $4.6 \times 10^{-4}$  moles. Se elige por tanto esta cantidad como óptima para posteriores estudios.

### B.2 Influencia del pH de la muestra

Teniendo en cuenta que para la formación del par iónico es necesario que el amitrol se encuentre cargado positivamente (pH inferiores a 4.2), y que dada la naturaleza del

cartucho  $C_{18}$ , no es recomendable trabajar con muestras con un pH inferior a 3.0, el margen de pH en el cual podemos trabajar es muy limitado.

Se realiza nuevamente el mismo proceso de preconcentración y análisis descrito en los estudios anteriores, a una muestra de 50.0 mL de agua a la cual se le adiciona  $2.4 \times 10^{-7}$  moles de amitrol,  $1.3 \times 10^{-3}$  moles de ácido fosfórico y  $4.6 \times 10^{-4}$  moles de SDS, pero en esta ocasión el pH de la muestra se ajusta a pH 3.0, para posteriormente comparar los resultados con los obtenidos hasta el momento ajustando la muestra a pH 3.5.

En la figura 93 se muestran los voltamperogramas de barrido lineal obtenidos.

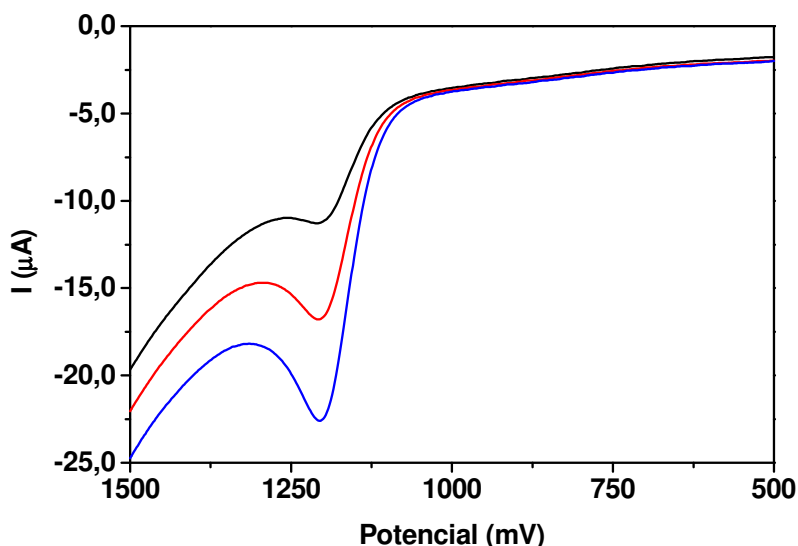


Figura 93.- Voltamperogramas de barrido lineal obtenidos para la muestra ajustada a pH 3.0 una vez sometida al proceso de preconcentración (—) y las dos adiciones de amitrol en concentración  $1.00 \times 10^{-4}$  (—) y  $2.10 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  (—) respectivamente. Velocidad de barrido:  $50 \text{ mV s}^{-1}$ .

El porcentaje de recuperación obtenido es del 106 %. Dado que los resultados obtenidos no difieren significativamente de los obtenidos ajustando la muestra a un pH 3.5, se elige un valor de 3.0 como pH óptimo en posteriores estudios ya que a este valor la proporción de amitrol cargado es mayor (ver diagrama de fracciones molares de amitrol).

A continuación se recogen en la figura 94 las condiciones óptimas de preconcentración y medida.

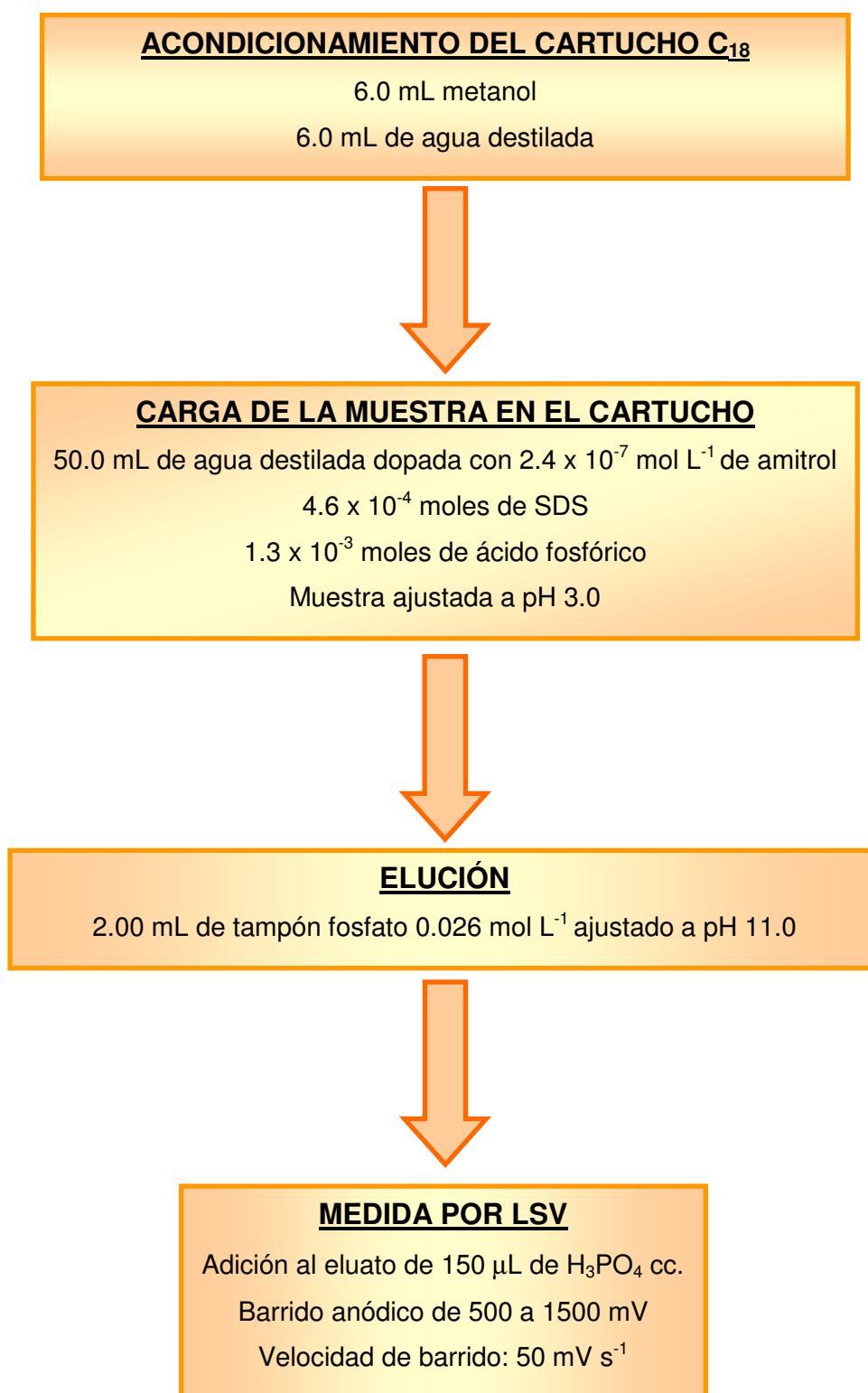


Figura 94.- Proceso óptimo para la preconcentración y análisis de amitrol en agua destilada.

### **B.3 Cálculo de los límites de detección y determinación**

En las condiciones óptimas de preconcentración se evalúa el límite de detección y determinación de la metodología desarrollada.

Para ello se estudian blancos de agua sin dopar con amitrol. Sobre estos blancos se realizan sucesivas adiciones de amitrol, analizando posteriormente cada una de ellas.

Los voltamperogramas obtenidos para un blanco de muestra y las distintas adiciones realizadas, se muestran en la figura 95 A. La figura 95 B muestra la evolución de la intensidad de pico con la concentración de amitrol, mostrando una variación lineal con ecuación de regresión:

$$I_p (\mu\text{A}) = (0.3 \pm 0.3) + (5.7 \pm 0.2) \times 10^4 C (\text{mol L}^{-1}), r = 0.9992, (n=4)$$

Los límites de detección y determinación se calculan a partir de tres y diez veces la desviación estándar de la intensidad del blanco al potencial de pico<sup>83</sup>, obteniéndose para las diez réplicas un límite de detección de  $3 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  ( $25 \mu\text{g L}^{-1}$ ) y un límite de determinación de  $1.1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  ( $91 \mu\text{g L}^{-1}$ ), para volúmenes de muestra de 50.0 mL, es decir para un factor de preconcentración de 25 veces.

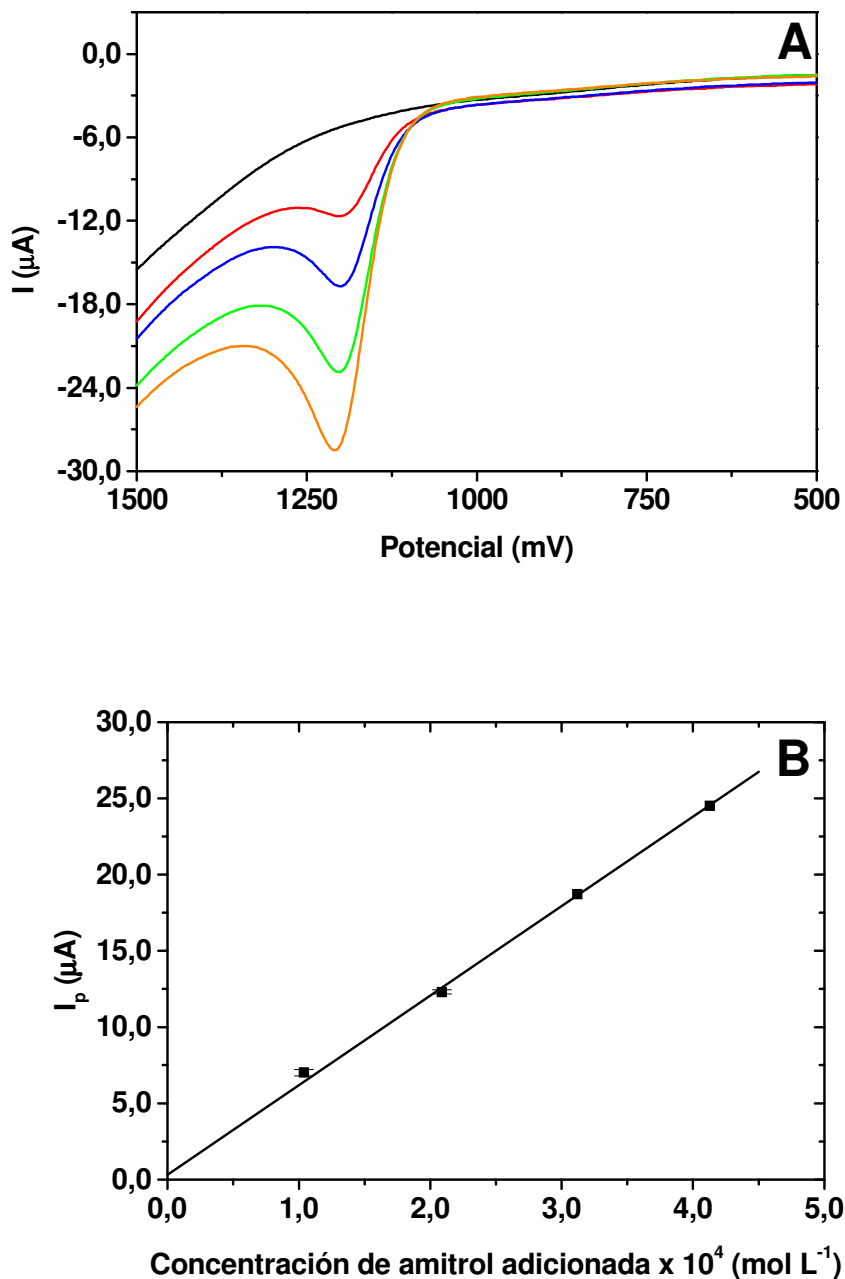


Figura 95.- Voltamperogramas de barrido lineal del blanco de muestra (—) y de diferentes adiciones de amitrol:  $1.00 \times 10^{-4}$  (—),  $2.10 \times 10^{-4}$  (—),  $3.20 \times 10^{-4}$  (—) y  $4.20 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  (—), (A). Evolución de la intensidad de pico con la concentración adicionada de amitrol (B). Velocidad de barrido  $50 \text{ mV s}^{-1}$ . Se incluye la desviación estándar de los puntos ( $n = 3$ ).

### **C. Determinación de amitrol en muestras de agua de río**

Una vez puesto a punto el método de preconcentración de amitrol en las muestras de agua destilada, descrito en la figura 94, se procede a estudiar la aplicabilidad de este procedimiento en muestras de agua del río Alberche.

Para ello, se toman diferentes muestras de agua del río Alberche obtenidas en diferentes puntos de la Comunidad de Madrid. Las muestras se dopan con diferentes cantidades de amitrol y se filtran para su posterior preconcentración y análisis.

En la figura 96 se muestran los voltamperogramas de barrido lineal obtenidos para una muestra de agua sin dopar, una muestra de agua dopada con amitrol y dos adiciones sucesivas de amitrol, así como la evolución de la intensidad de pico con la concentración de amitrol adicionada.

De los voltamperogramas obtenidos se deduce que el agua analizada no contiene amitrol al nivel de concentración detectable con la metodología desarrollada. Se comprueba que la concentración de amitrol encontrada en el agua dopada se corresponde con la concentración de amitrol añadida, lo que demuestra la aplicabilidad del método en agua de río.

A continuación y con el fin de disminuir los límites de detección se realiza un estudio del volumen de muestra, variando éste entre 50 y 200 mL, manteniendo constante el número de moles de SDS adicionado a la muestra así como el volumen de elución y el número de moles totales de amitrol.

En la tabla 40 se muestran los resultados obtenidos para los distintos volúmenes empleados, dopados todos ellos con  $2.4 \times 10^{-7}$  moles de amitrol.



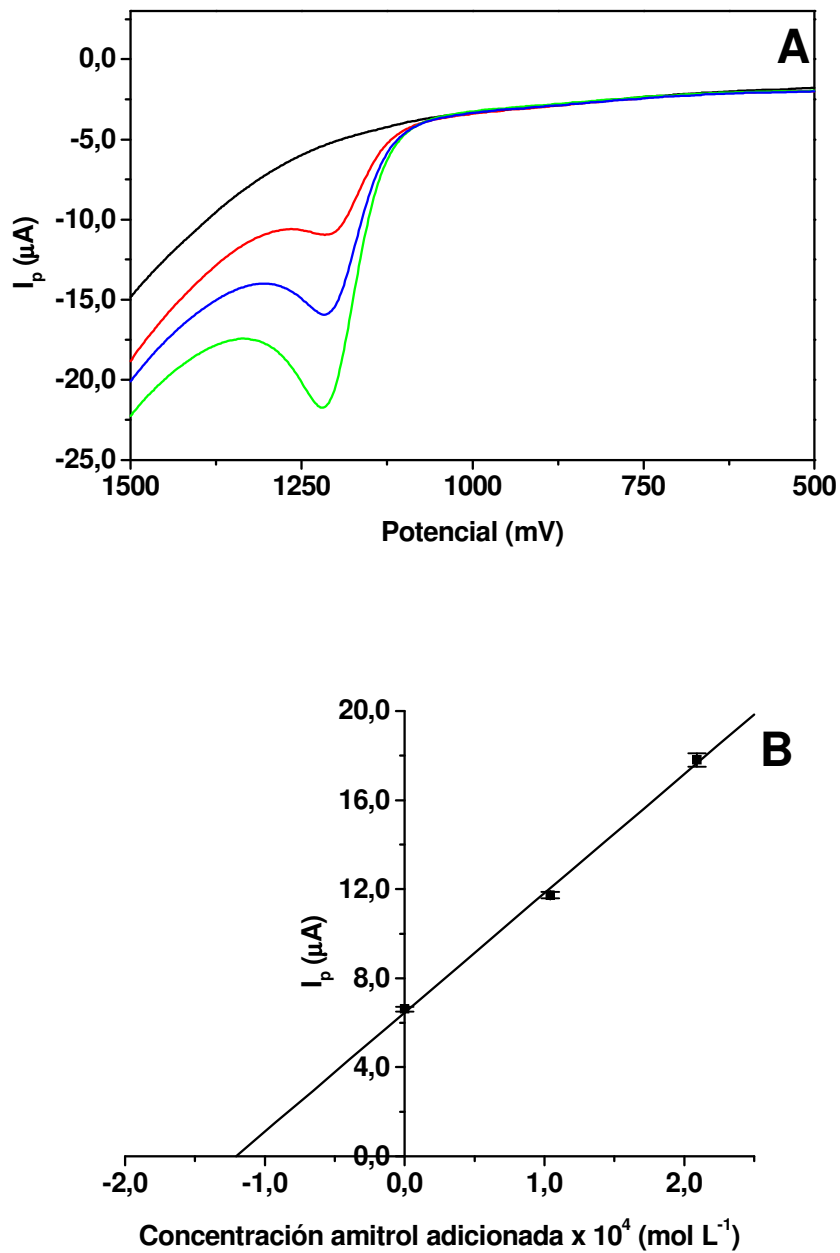


Figura 96- Voltamperogramas de barrido lineal del blanco de muestra (—), muestra (—) y adiciones de amitrol:  $1,00 \times 10^{-4}$  (—),  $2,10 \times 10^{-4}$  (—) (A). Evolución de la intensidad de pico con la concentración adicionada de amitrol (B). Velocidad de barrido  $50 \text{ mV s}^{-1}$ .

Tabla 40.- Influencia del volumen de muestra en la preconcentración de amitrol.

Volumen (mL)	[Amitrol] <sub>puesto</sub> mol L <sup>-1</sup>	[Amitrol] <sub>encontrado</sub> mol L <sup>-1</sup>	n	Sensibilidad (μA L mol <sup>-1</sup> )	Recuperación (%)
50	4.8 x 10 <sup>-6</sup>	4.8 x 10 <sup>-6</sup>	3	(5.4 ± 0.2) x 10 <sup>4</sup>	100
100	2.4 x 10 <sup>-6</sup>	2.6 x 10 <sup>-6</sup>	3	(4.4 ± 0.2) x 10 <sup>4</sup>	107
200	1.2 x 10 <sup>-6</sup>	1.2 x 10 <sup>-6</sup>	3	(4.9 ± 0.2) x 10 <sup>4</sup>	100

A la vista de los resultados obtenidos se puede concluir que se pueden emplear volúmenes de muestra de hasta 200 mL, permitiendo preconcentrar 100 veces la muestra de agua.

### C.1 Cálculo de los límites de detección y determinación

El cálculo de los límites de detección y determinación se realiza estudiando diez blancos de agua de río una vez sometidos al proceso de preconcentración, a partir de la desviación estándar de la intensidad del blanco al potencial de pico<sup>83</sup>.

Para un volumen de muestra de 200 mL el límite de detección obtenido es 8 x 10<sup>-8</sup> mol L<sup>-1</sup> (7 μg L<sup>-1</sup>) y el límite de determinación, 3 x 10<sup>-7</sup> mol L<sup>-1</sup> (25 μg L<sup>-1</sup>).

Hay que indicar aquí que el procedimiento de preconcentración puesto a punto permite preconcentrar 100 veces la muestra. Hasta el momento actual, no existe ningún procedimiento de este tipo para la preconcentración de amitrol en el que se alcancen estos niveles de preconcentración, salvo por evaporación del agua<sup>48,50</sup>.

## **5.2 ESTUDIOS ELECTROANALÍTICOS DE AMITROL EN ELECTRODOS DE PASTA DE NANOTUBOS DE CARBONO. VOLTAMPEROMETRÍA DE ADSORCIÓN-REDISOLUCIÓN DE AMITROL.**

(**NOTA:** A partir de este estudio, los registros obtenidos por voltamperometría de barrido lineal para barridos anódicos se muestran con intensidad positiva)



Los nanotubos de carbono (CNTs) fueron descubiertos en Japón en 1991 por **S. Iijima**<sup>165</sup> durante la realización de trabajos de investigación sobre fullerenos. A pesar de la simplicidad de su estructura cristalina, los CNTs poseen propiedades muy atractivas como son: alta conductividad, alta estabilidad química, alta fuerza mecánica y elasticidad<sup>166</sup>, lo que les ha convertido en un importante grupo de nanomateriales, sujeto a numerosas investigaciones.

Esencialmente son estructuras de capas de grafito enrolladas sobre si mismas en forma de cilindros, tal como se muestra en la figura 97.

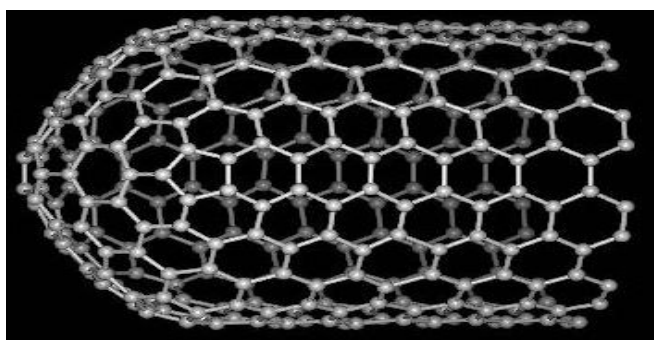


Figura 97.- Estructura de los nanotubos de carbono

Existen dos formas de nanotubos de carbono:

- “*Single-wall carbon nanotubes*” (SWCNTs): Constituidos por una única capa de grafito enrollada sobre si misma en forma de cilindro.
- “*Multi-wall carbon nanotubes*” (MWCNTs): Formados por múltiples capas de grafito enrolladas en forma de cilindros concéntricos.

Los CNTs están siendo ampliamente utilizados en electroanálisis, debido a sus propiedades eléctricas. Existe un elevado número de aplicaciones en análisis voltamperométrico donde los CNTs son empleados como material de electrodo o como modificadores de los electrodos de trabajo convencionales, generalmente electrodos de “*glassy carbon*”<sup>167</sup>. En la mayoría de los casos, los electrodos de nanotubos de carbono, muestran un mejor comportamiento que otros electrodos de carbono.

La mejora obtenida es atribuida a sus nanodimensiones, a los defectos topológicos presentes en la superficie del nanotubo<sup>168</sup> y a su estructura electrónica. Recientemente,

**Compton y Banks**<sup>169</sup> concluyen que esta mejora no es debida a los nanotubos en sí, sino que se produce únicamente como consecuencia de las diferentes propiedades electroquímicas que presenta la superficie, “*basal plane*”, y el borde, “*edge plane*”, de una lámina de grafito, en la que la transferencia electrónica ocurre únicamente en el borde (*edge plane*) de ésta. En el caso de los electrodos construidos con CNTs y en especial los construidos con MWCNTs, debido a su estructura de capas de grafito enrolladas, presentan en superficie muchos bordes, “*edge plane*”, y es por ello que muestran un mejor comportamiento que el resto de electrodos de carbono, cuya proporción de bordes, “*edge plane*”, en superficie es menor.

Además de la mejora obtenida en la respuesta electroquímica de muchos procesos electroquímicos, los CNT presentan una alta capacidad adsorptiva que los hace idóneos en el análisis voltamperométrico de adsorción-redisolución<sup>167</sup>.

El primer electrodo de nanotubos de carbono fue fabricado por **Britto y col.**<sup>165</sup>. Lo emplearon en el estudio de la oxidación de dopamina, donde muestra un mejor comportamiento que el electrodo de “*glassy carbon*”. La dopamina muestra en este electrodo mayor velocidad de reacción y mayor reversibilidad del proceso electroquímico. Desde entonces los CNTs se han empleado en la fabricación de electrodos para el estudio y determinación de muchas sustancias, entre ellas: citocromo C<sup>170</sup>, óxido nítrico<sup>171</sup>, cadmio<sup>172</sup>, catecol<sup>173</sup>, ácido úrico<sup>174</sup>, 2,4,6-trinitrotolueno<sup>175</sup> y NADH<sup>176</sup>. Estos electrodos muestran propiedades electrocatalíticas en los numerosos procesos electroquímicos estudiados, proporcionando bajos límites de detección y alta sensibilidad en los análisis. Además, muestran una alta resistencia a la contaminación de su superficie<sup>177</sup>.

La modificación de los electrodos de trabajo convencionales con CNTs, se ha realizado siguiendo diferentes procedimientos. El más empleado, es la dispersión de los CNTs en la superficie del electrodo por evaporación de una suspensión de CNTs sobre ésta. Esta suspensión se ha preparado en bromoformo<sup>167</sup>, etanol<sup>178</sup>, N,N-dimetilformamida<sup>179</sup> y más recientemente con polietilenimina<sup>180</sup>.

Otros métodos de modificación descritos son la incorporación de MWCNTs en el gel hexafluorofosfato 1-octil-3-metilimidazolina<sup>181</sup>, la incorporación a una capa de polianilina electropolimerizada<sup>182</sup>, la inmovilización abrasiva de aglomerados de MWCNTs<sup>183</sup> y por enlace Au-S entre grupos tiol de los nanotubos funcionalizados y la superficie de un electrodo de oro<sup>184</sup>.

También se ha preparado una nueva pasta de carbono basada en la mezcla de CNTs con aceite mineral<sup>185-187</sup>. Los electrodos constituidos por esta pasta de CNTs (CNTPE) presentan las propiedades de los nanotubos de carbono junto con las del material compuesto, propiamente dicho.

En el desarrollo de este capítulo se mostrara la aplicabilidad de los electrodos de pasta de nanotubos de carbono (CNTPE) en la determinación de amitrol empleando la voltamperometría de redisolución adsortiva (AdSV).

### **5.2.1 ENSAYOS PREVIOS**

#### **A. Pretratamiento de los electrodos de pasta de nanotubos de carbono**

En general, el pretratamiento de los CNTPE<sup>187-192</sup> previo a la medida electroquímica produce grandes mejoras en el comportamiento electroquímico de diferentes compuestos.

Se ha estudiado la influencia de diferentes pretratamientos potencioestáticos y potenciodinámicos en la señal anódica de amitrol en tampón acetato 0.025 mol L<sup>-1</sup> de pH 4.5, empleando CNTPE preparados por mezcla de MWCNTs con aceite mineral en proporción 50:50. Se utilizan para ello nanotubos de carbono de distinta longitud (MWCNTs cortos de 1-5 μm de longitud y MWCNTs largos de 5-20 μm de longitud) y de 20-50 nm de diámetro. Los electrodos se fabrican siguiendo el procedimiento descrito en la sección 3.3.2.B (pág. 43) de esta Memoria.

El pretratamiento potencioestático se realiza aplicando diferentes potenciales, 1.00, 1.50 y 1.75 V durante 1.0 min en tampón fosfato 0.050 mol L<sup>-1</sup> de pH 7.4. Este pretratamiento produce un gran aumento de la corriente de fondo del electrodo, que dificulta la determinación de amitrol.

El pretratamiento potenciodinámico se realiza por voltamperometría cíclica en diferentes medios: tampón fosfato 0.050 mol L<sup>-1</sup> de pH 7.4 y tampón acetato 0.025 mol L<sup>-1</sup> de pH 4.5. Este tratamiento produce una mejora en la señal anódica de amitrol que depende de la naturaleza del electrolito, de los potenciales límites de los barridos y del número de ciclos.

En la figura 98 se muestra la evolución del potencial de pico e intensidad de pico de la señal anódica de amitrol en medio acetato 0.025 mol L<sup>-1</sup> de pH 4.5, para una concentración de amitrol 1.00 x 10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup>, con el número de ciclos de activación realizados entre -1.00 y 1.50 V a 1.0 V s<sup>-1</sup> en tampón fosfato 0.050 mol L<sup>-1</sup> de pH 7.4 para los dos tipos de CNTPE empleados.

Puede observarse en la figura 98 A, que el incremento del número de ciclos de activación, disminuye el potencial de pico e incrementa considerablemente la intensidad de pico de la señal de oxidación de amitrol. Con tan solo 20 ciclos de activación, el potencial de pico disminuye 200 y 167 mV y la corriente de pico aumenta un 55 % y un 41 % para los CNTPE cortos y largos respectivamente, con respecto a la señal obtenida sin activación. Con



50 ciclos de activación, el potencial de pico disminuye 218 y 237 mV siendo el aumento de la corriente de pico de un 297 % y un 273 %, para los CNTPE cortos y largos respectivamente.

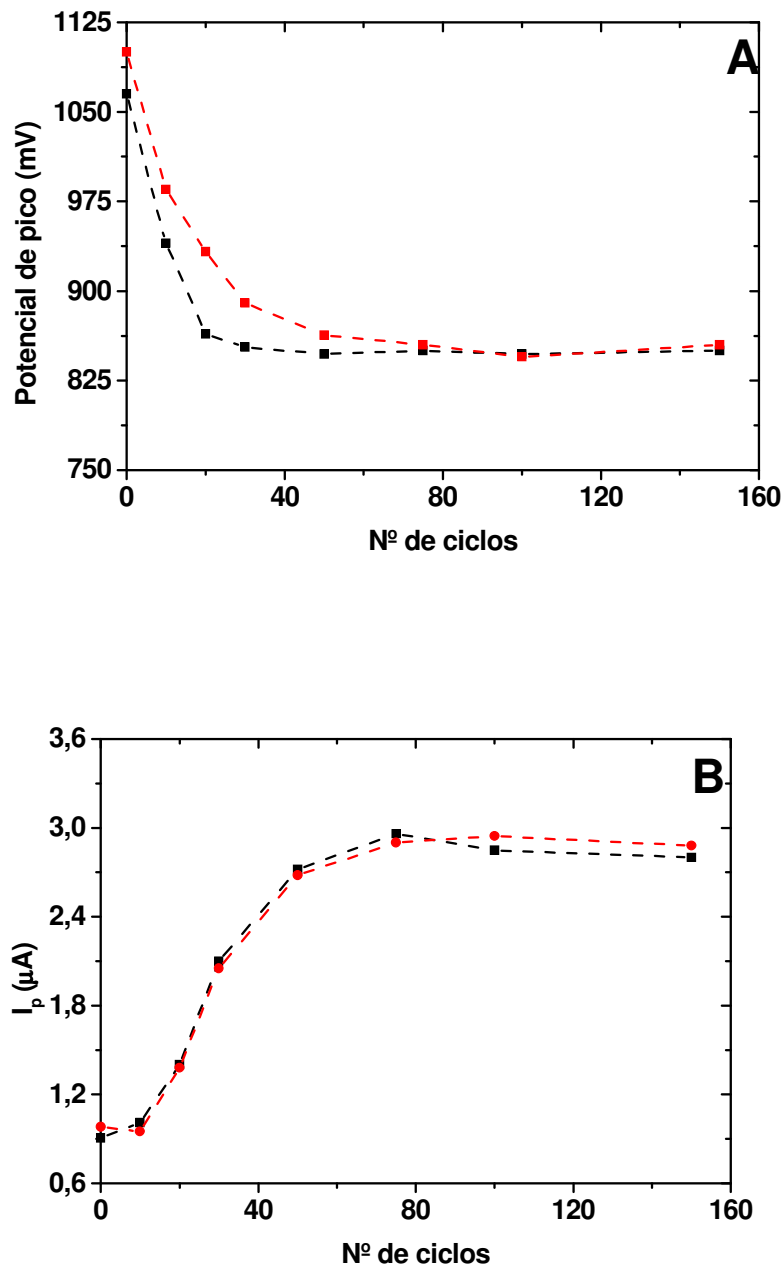


Figura 98. Influencia del número de ciclos de activación en el potencial de pico (A) y en la intensidad de pico (B) de la señal anódica de amitrol  $1.00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  en tampón acetato  $0.025 \text{ mol L}^{-1}$  de pH 4.5, para los dos tipos de CNTPE empleados: cortos (1-5 $\mu m$ ) (■) y largos (5-20 $\mu m$ ) (■). Velocidad de barrido:  $50 \text{ mV s}^{-1}$ . Medio de activación: tampón fosfato  $0.050 \text{ mol L}^{-1}$  de pH 7.4.

En base a los resultados obtenidos, se elige como activación óptima la realización de 75 ciclos entre -1.00 y 1.50 V a  $1.0 \text{ V s}^{-1}$  en tampón fosfato  $0.050 \text{ mol L}^{-1}$  de pH 7.4.

En la figura 99 se muestran los voltamperogramas de barrido lineal obtenidos en una disolución de amitrol  $1.00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , en tampón acetato  $0.025 \text{ mol L}^{-1}$  de pH 4.5, realizando barridos entre 600 y 1300 mV a una velocidad de barrido de  $50 \text{ mV s}^{-1}$ . Se realiza el mismo procedimiento empleando los dos tipos de CNTPE (cortos y largos), sin activar y previamente activados empleando el proceso de activación óptimo establecido.

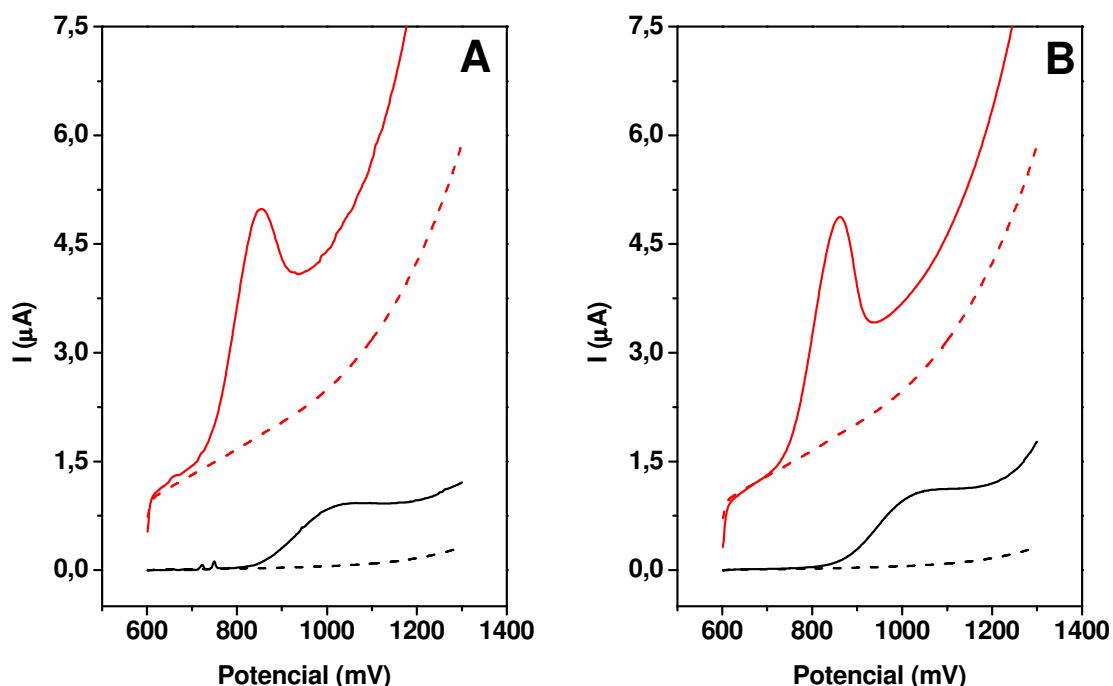


Figura 99.- Voltamperogramas de barrido lineal obtenidos en una disolución de amitrol  $1.00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  en tampón acetato  $0.025 \text{ mol L}^{-1}$  de pH 4.5 utilizando CNTPE cortos (A) y largos (B): activados (—) y sin activar (---). Velocidad de barrido  $50 \text{ mV s}^{-1}$ . Activación del electrodo: Realizando 75 ciclos entre -1.00 y 1.50 V en tampón fosfato  $0.050 \text{ mol L}^{-1}$  de pH 7.4, a una velocidad de barrido de  $1.0 \text{ V s}^{-1}$ .

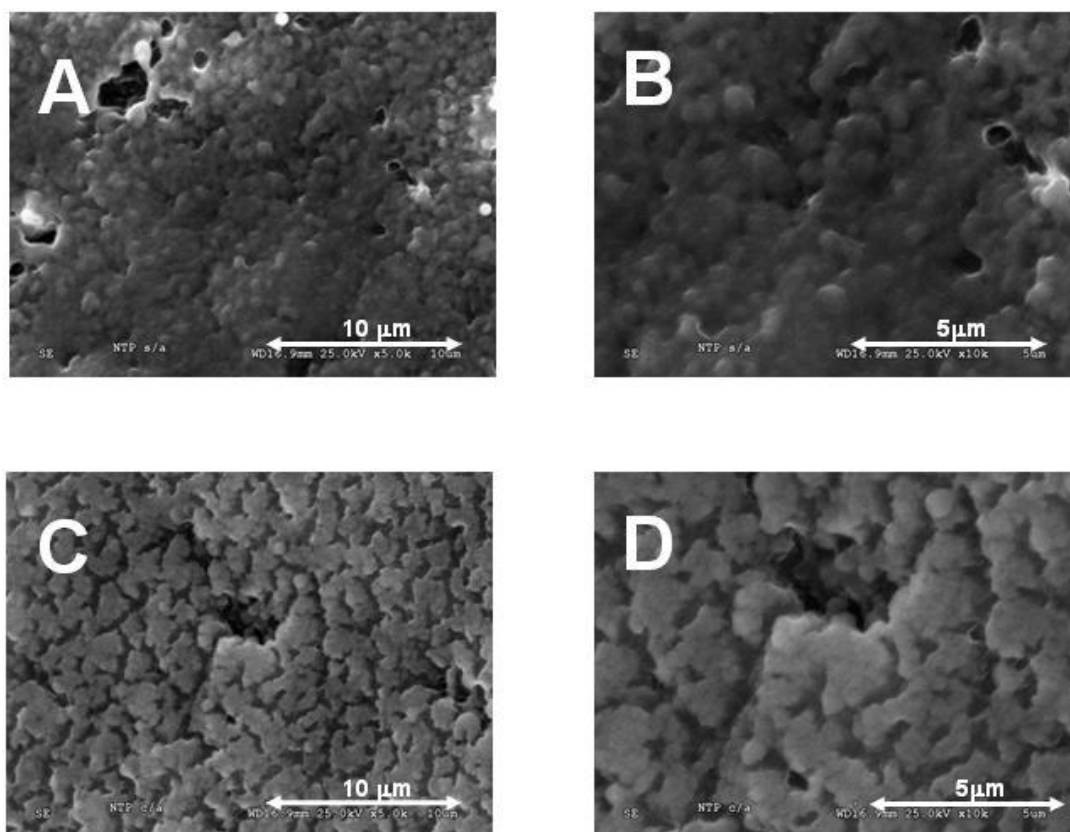
El efecto catalítico observado por el pretratamiento de los CNTPEs en la señal anódica del amitrol puede deberse a varios factores. Por un lado, a un posible cambio en la estructura electrónica del material como consecuencia del pretratamiento del electrodo<sup>190</sup>, y/o a un aumento de la superficie activa del electrodo como consecuencia de éste. En muchos de los estudios realizados hasta el momento se ha concluido que los pretratamientos

incrementan la porosidad de la superficie del electrodo, lo que da lugar a un aumento de la superficie activa de éste<sup>172,185,193</sup>.

Por el momento no ha quedado demasiado claro cuales son las especies responsables del mecanismo de activación, aunque se piensa que durante ésta, se forman grupos funcionales oxigenados<sup>194-196</sup>, como ocurre cuando los CNTs están expuestos a un medio ácido fuerte<sup>191</sup>. Se ha comprobado que el incremento en la superficie de estos grupos funcionales, favorece la transferencia de carga de los procesos electroquímicos.

Para ver el efecto de la activación realizada sobre la superficie del electrodo se realizan estudios por microscopía de barrido electrónico (SEM) con los electrodos activados y sin activar.

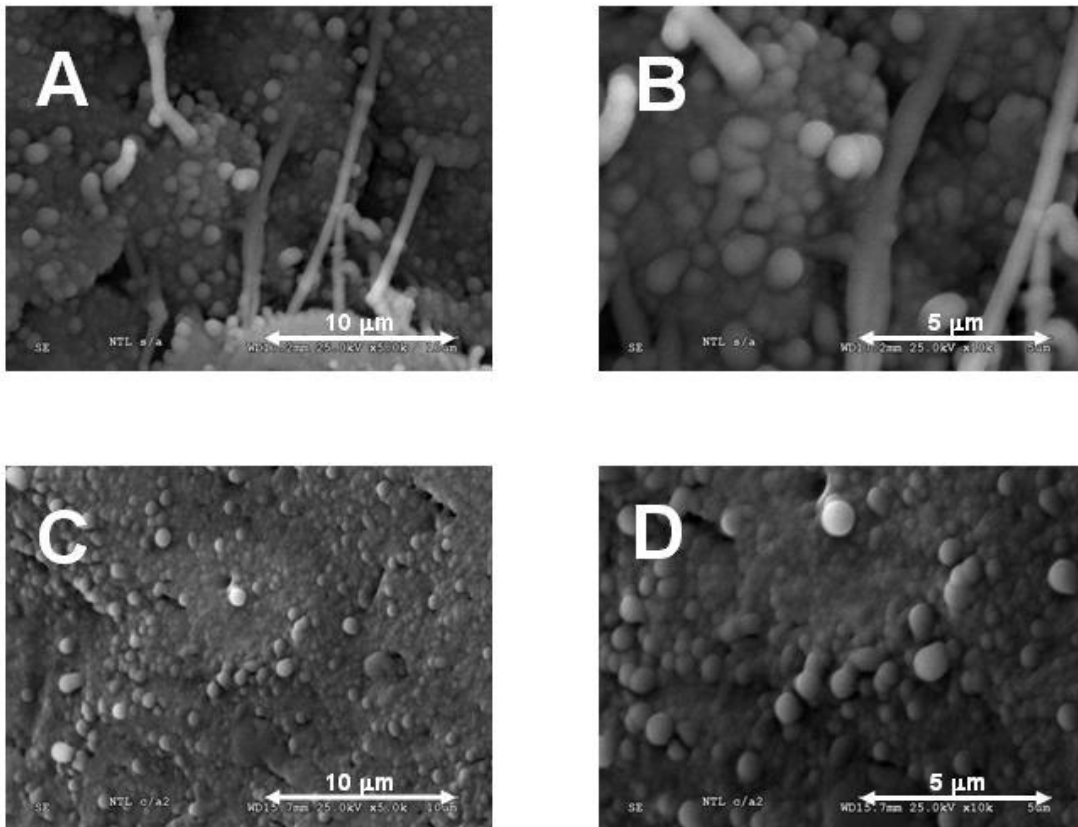
En la figura 100 se muestran las imágenes obtenidas por SEM de la superficie de los CNTPEs preparados con MWCNTs cortos, antes y después de someterlos al proceso de activación.



**Figura 100.-** Imágenes obtenidas por SEM de CNTPE preparados con MWCNTs cortos antes (A y B) y después (C y D) del pretratamiento. Aumentos: A) C) 5000 x y B) y D) 10000 x

Después del pretratamiento se puede observar una superficie más esponjosa, debido quizás a la pérdida del aceite mineral durante el proceso de activación, aumentando por tanto la superficie activa del electrodo.

En la figura 101 se muestran las imágenes para la superficie de los CNTPEs preparados con MWCNTs largos, antes y después de someterlos al proceso de activación.



**Figura 101.-** Imágenes obtenidas por SEM de CNTPE preparados con MWCNTs largos antes (A y B) y después (C y D) del pretratamiento. Aumentos: A) y C) 5000 x y B) y D) 10000 x.

Antes del pretratamiento, figura 101 A y B, los MWCNTs se encuentran organizados no solo verticalmente a la superficie, sino también paralelamente a ésta, se observan también asociaciones de nanotubos de carbono, aglutinados por el aceite mineral. Después del pretratamiento, las imágenes de la superficie activada, figura 101 C y D, muestran que los MWCNTs se encuentran organizados en una estructura más ordenada, la mayoría de ellos perpendiculares a la superficie. Esta ordenación de los CNTs posiblemente sea un factor importante en la mejora obtenida en la señal anódica del amitrol, favoreciendo la transferencia electrónica.

## 5.2.2 ELECCIÓN DEL MEDIO DE MEDIDA

### A. Elección del pH

Para la elección del pH del medio de medida se preparan disoluciones de amitrol en concentración  $5.00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  en ácido fosfórico  $0.026 \text{ mol L}^{-1}$  y tampón acetato  $0.025 \text{ mol L}^{-1}$  de pH 4.5.

Se registran los voltamperogramas de barrido lineal entre 600 y 1300 mV utilizando un CNTPE preparado con MWCNT cortos, activado, según el procedimiento puesto a punto, y sin activar.

En la figura 102 se muestran los voltamperogramas obtenidos en ambos medios.

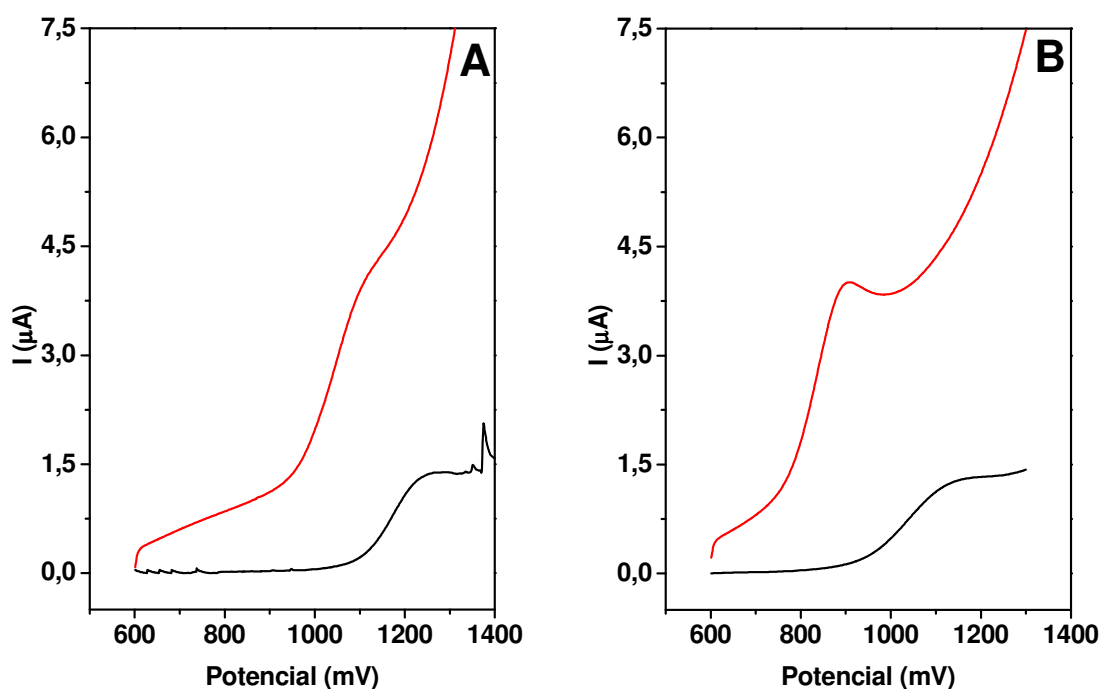


Figura 102.-Voltamperogramas de barrido lineal obtenidos en medio ácido fosfórico  $0.026 \text{ mol L}^{-1}$  de pH 2.0 (A) y tampón acetato  $0.025 \text{ mol L}^{-1}$  de pH 4.5 (B) con un CNTPE preparado con MWCNT cortos, sin activar (—) y activados (—). Concentración de amitrol:  $5.00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ , velocidad de barrido  $50 \text{ mV s}^{-1}$ . Activación del electrodo óptima.

En la tabla 41 se muestran los valores de la intensidad de pico y del potencial de pico obtenidos con el electrodo activado y sin activar en ambos medios, así como la mejora obtenida en cuanto a potencial e intensidad de pico con el proceso de activación.

Tabla 41.- Influencia del pH en la señal anódica de amitrol.

Medio	Electrodo	$I_p$ ( $\mu\text{A}$ )	$E_p$ (mV)	$\Delta I_p$ ( $\mu\text{A}$ )	$\Delta E_p$ (mV)
Ácido fosfórico 0.026 mol L <sup>-1</sup>	Sin Activar	1.0	1280	1.5	142
	Activado	2.5	1138		
Tampón acetato 0.025 mol L <sup>-1</sup> pH 4.5	Sin Activar	1.2	1160	1.2	310
	Activado	2.4	850		

Resultados obtenidos de la media de tres análisis

A la vista de los resultados obtenidos, se elige como medio de medida para posteriores estudios, tampón acetato 0.025 mol L<sup>-1</sup> de pH 4.5, ya que en este medio y pH se obtiene una señal anódica más definida y un menor potencial de pico.

## B. Influencia de la concentración

Una vez seleccionado el medio de medida, se estudia la influencia de su concentración en la señal anódica de amitrol.

Para ello se preparan disoluciones de amitrol en concentración  $5.00 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> en tampón acetato de diferentes concentraciones: 0.012, 0.025, 0.050 y 0.075 mol L<sup>-1</sup>, ajustando su pH a 4.5. Se registran barridos anódicos entre 600 y 1300 mV, a una velocidad de barrido de 50 mV s<sup>-1</sup>, con un CNTPE preparado con MWCNTs cortos, activado y sin activar.

En la tabla 42 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 42.- Influencia de la concentración del medio de medida en la señal anódica de amitrol.

Concentración (mol L <sup>-1</sup> )	Electrodo	I <sub>p</sub> (μA)	E <sub>p</sub> (mV)	ΔI <sub>p</sub> (μA)	ΔE <sub>p</sub> (mV)
0.012	Sin Activar	1.3	1130	0.9	224
	Activado	2.2	906		
0.025	Sin Activar	1.2	1160	1.2	310
	Activado	2.4	850		
0.050	Sin Activar	0.9	1126	1.6	286
	Activado	2.5	840		
0.075	Sin Activar	1.2	1093	1.1	167
	Activado	2.3	926		

Resultados obtenidos de la media de tres análisis.

A la vista de los resultados obtenidos, se elige como medio de medida para posteriores estudios tampón acetato 0.050 mol L<sup>-1</sup> de pH 4.5.

### 5.2.3 INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE AMITROL

Para la realización de este estudio se preparan disoluciones de amitrol en concentraciones comprendidas entre  $1.70 \times 10^{-5}$  y  $1.30 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> en tampón acetato 0.050 mol L<sup>-1</sup> de pH 4.5. El estudio se realiza utilizando como electrodos de trabajo CNTPEs preparados con MWCNTs (cortos y largos) y aceite mineral, en proporción 50:50.

#### A. Estudio empleando “multi wall carbon nanotubes” cortos

Se realizan barridos anódicos entre 600 y 1300 mV a una velocidad de barrido de 50 mV s<sup>-1</sup> con el electrodo sin activar, y activando el electrodo antes del inicio del estudio.

En la figura 103 se muestra la variación de la intensidad de pico con la concentración en los electrodos estudiados.

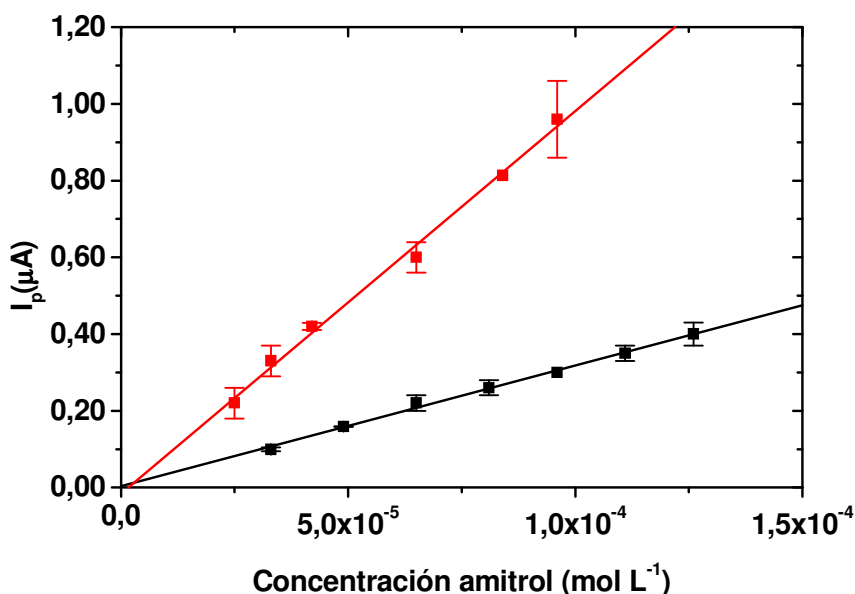


Figura 103.- Influencia de la concentración en la intensidad de pico utilizando un CNTPE preparado con MWCNTs cortos, sin activar (■) y activado (■). Medio de medida: tampón acetato 0.050 mol L<sup>-1</sup> de pH 4.5, velocidad de barrido: 50 mV s<sup>-1</sup>. Activación del electrodo óptima. Se incluye desviación estándar de los datos (n=3).



La intensidad de pico muestra variación lineal con la concentración, tanto para el electrodo activado como para el electrodo sin activar.

En la tabla 43 se muestran las ecuaciones de regresión obtenidas y los coeficientes de regresión lineal, en cada uno de los casos.

Tabla 43.- Influencia de la concentración de amitrol en la intensidad de pico, empleando un CNTPE preparado con MWCNTs cortos activado y sin activar.

Electrodo	Ecuación de regresión	r, n
Sin activar	$I_p (\mu A) = (3 \pm 7) \times 10^{-3} + (3.1 \pm 0.1) \times 10^3 C (\text{mol L}^{-1})$	0.998 (n = 7)
Activado	$I_p (\mu A) = (-2 \pm 2) \times 10^{-2} + (1.0 \pm 0.4) \times 10^4 C (\text{mol L}^{-1})$	0.997 (n = 6)

Pendiente:  $\mu A L mol^{-1}$  y ordenada en el origen:  $\mu A$ .

La utilización de un electrodo de pasta de nanotubos de carbono previamente activado proporciona una elevada sensibilidad en el análisis de amitrol por voltamperometría de barrido lineal.

Para poder comparar la sensibilidad de este electrodo con la obtenida con el electrodo de "glassy carbon" y teniendo en cuenta que ambos electrodos poseen diferente superficie, dividimos la sensibilidad obtenida por el área física del electrodo. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 44.

Tabla 44.- Sensibilidad hacia el amitrol en diferentes electrodos.

Electrodo	Diámetro (mm)	Área física (mm <sup>2</sup> )	Sensibilidad ( $\mu A L mol^{-1}$ )	Sensibilidad/área ( $\mu A L mol^{-1} mm^{-2}$ )
"Glassy carbon"	3.0	7.1	$(4.2 \pm 0.1) \times 10^4$	$5.9 \times 10^3$
CNTPE	0.8	0.5	$(1.0 \pm 0.4) \times 10^4$	$2.0 \times 10^4$

Estos resultados muestran que la utilización de un electrodo de pasta de nanotubos de carbono cortos activado proporciona una mayor sensibilidad, aproximadamente 3.4 veces superior en el análisis de amitrol, que el electrodo de "glassy carbon".

## B. Estudio empleando “multi wall carbon nanotubes” largos

Se registran barridos anódicos entre 600 y 1050 mV a una velocidad de barrido de 50 mV s<sup>-1</sup> con el electrodo sin activar y activando el electrodo antes del inicio del estudio.

En los diferentes calibrados realizados, tanto con el electrodo activado como con el electrodo sin activar, se observa falta de reproducibilidad. Además, si se registran barridos sucesivos sobre una disolución que contiene amitrol, la señal anódica del herbicida aumenta con el número de barridos, como puede observarse en la figura 104.

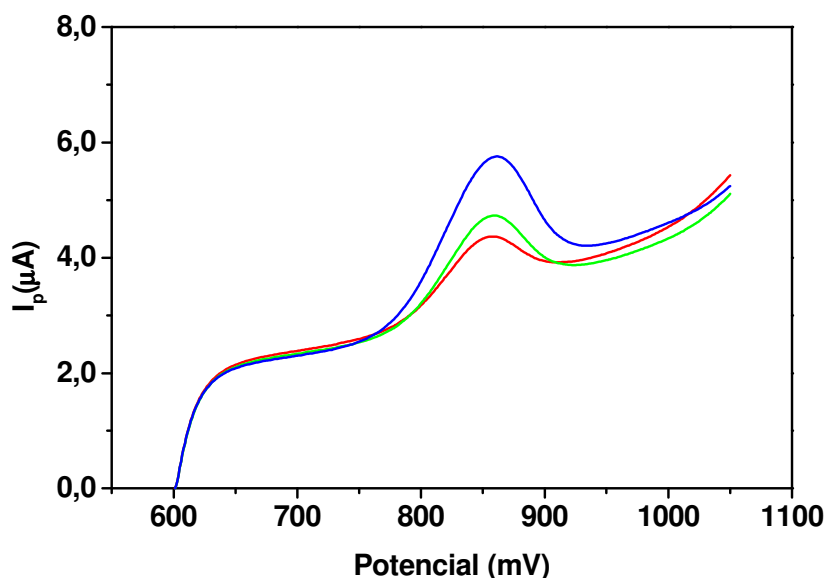


Figura 104.- Voltamperogramas de barrido lineal sucesivos: 1º (—), 2º (—) y 3º (—), obtenidos en una disolución de amitrol 1.00 x 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup> con CNTPE preparado con MWCNTs largos, previamente activado. Resto de condiciones igual que figura 103.

Estos hechos indicarían una posible adsorción de amitrol en el electrodo. Como consecuencia de ello, se hace necesario continuar estudiando el efecto de adsorción de amitrol sobre este tipo de CNTPEs.

#### **5.2.4. ADSORCIÓN DE AMITROL EN ELECTRODOS DE PASTA DE NANOTUBOS DE CARBONO PRETRATADOS**

La conocida capacidad adsortiva de los CNTs, ha dado lugar al desarrollo de nuevos métodos de determinación por voltamperometría de redisolución adsortiva (AdSV) empleando electrodos modificados con este material.

La voltamperometría de redisolución adsortiva se realiza en dos pasos:

**1<sup>er</sup> PASO:** En él se lleva a cabo la adsorción de los analitos. Para ello se sumerge el electrodo, en la disolución agitada del analito que se desea preconcentrar, durante un tiempo determinado, bien a circuito abierto o bien aplicando una diferencia de potencial entre el electrodo y un electrodo de referencia.

**2<sup>o</sup> PASO:** Se realiza la medida electroquímica de oxidación o de reducción del analito adsorbido, introduciendo el electrodo, previamente lavado, en una disolución del electrolito soporte.

Este procedimiento se ha empleado en la determinación anódica y catódica de numerosos compuestos orgánicos.<sup>175,189,197-200</sup>

Se estudia la capacidad adsortiva, hacia amitrol, de los dos tipos de CNTPEs preparados con MWCNTs (cortos y largos) y aceite mineral en proporción 50:50, previamente activados.

Para ello se sumerge el electrodo en una disolución de amitrol en concentración  $5.00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  en medio acetato  $0.050 \text{ mol L}^{-1}$  de pH 4.5 durante 120 s. El electrodo se saca, se lava con agua destilada y se introduce en una disolución de acetato  $0.050 \text{ mol L}^{-1}$  de pH 4.5 y realizando el barrido anódico entre 600 y 1050 mV a una velocidad de barrido  $50 \text{ mV s}^{-1}$

Se observa una adsorción de amitrol importante en el caso de los CNTPEs preparados con MWCNTs largos en contraste con el electrodo preparado con MWCNTs cortos, donde no se obtiene señal alguna. Esto está en perfecta consonancia con los resultados obtenidos en el apartado 5.2.3 de este capítulo. Por lo tanto se elige los CNTPE preparados con MWCNTs largos para posteriores estudios.

En la figura 105 se muestra la señal obtenida después de haber realizado la preconcentración de amitrol  $5.00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  durante 120 s en tampón acetato  $0.050 \text{ mol L}^{-1}$  de pH 4.5.

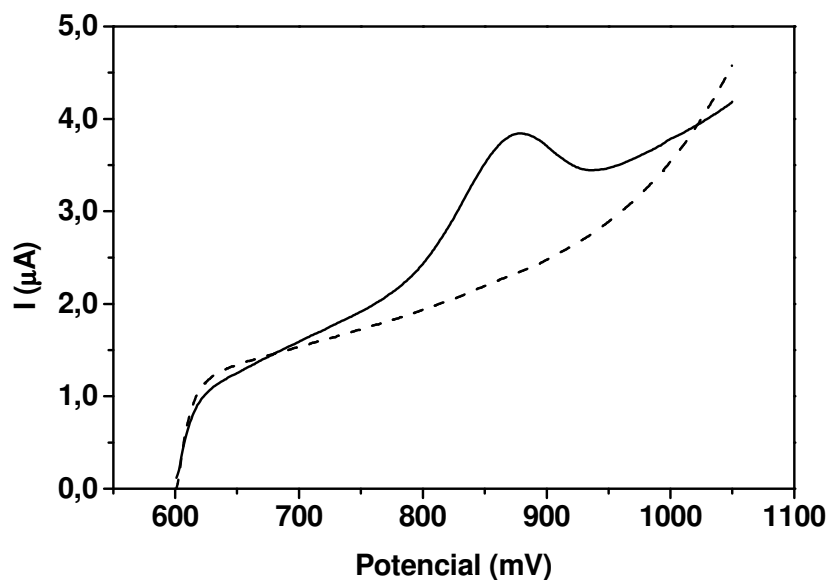


Figura 105.- Voltamperogramas de barrido lineal obtenidos con un CNTPE preparado con MWCNTs largos, activado. Preconcentración: durante 120 s en tampón acetato  $0.050 \text{ mol L}^{-1}$  solo (discontinuo) y con amitrol  $5.00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  (—); Medida: tampón acetato  $0.050 \text{ mol L}^{-1}$  de pH 4.5. Resto de condiciones igual que en figura 103.

### **5.2.5 CONDICIONES ÓPTIMAS DE PRECONCENTRACIÓN**

Se recogen en este apartado las variables que afectan al proceso de preconcentración de amitrol en la superficie del electrodo.

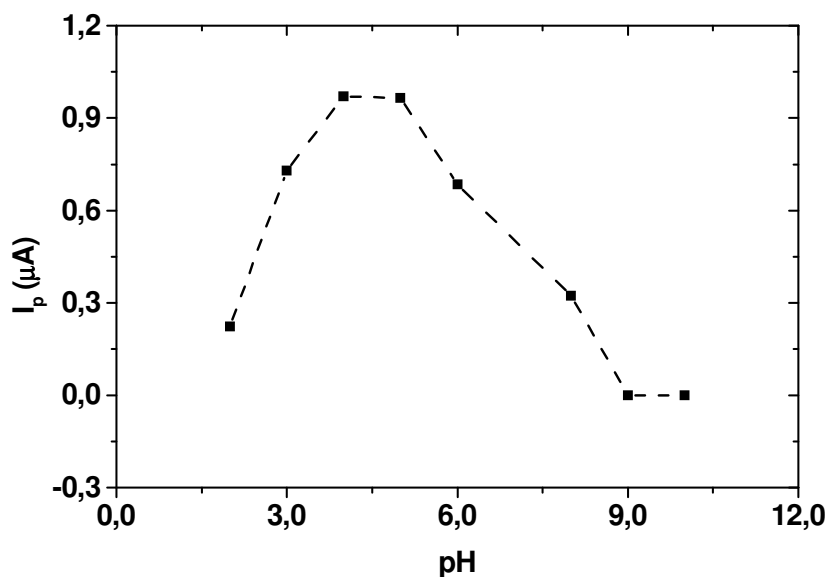
Estas variables son:

- pH del electrolito de preconcentración
- Concentración del electrolito de preconcentración
- Tiempo de preconcentración
- Potencial de preconcentración

#### **A. Influencia del pH.**

Se estudia la influencia del pH del electrolito de preconcentración sobre la intensidad de pico de la señal voltamperométrica de amitrol. Para ello, se utilizan disoluciones agitadas de amitrol  $5.00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  en tampón Britton-Robinson  $0.040 \text{ mol L}^{-1}$  de diferentes pH comprendidos entre 2.0 y 10.0. El tiempo de preconcentración es de 180 s, realizándose ésta a circuito abierto. Se registran los voltamperogramas de barrido lineal entre 600 y 1100 mV en una disolución de tampón acetato  $0.050 \text{ mol L}^{-1}$  de pH 4.5.

En la figura 106 se muestra la variación de la intensidad de pico con el pH. Se observa que la corriente de pico alcanza un valor máximo para valores de pH comprendidos entre 4.0 y 5.0. Se elige como pH óptimo 4.5 para estudios posteriores.



**Figura 106.- Influencia del pH del medio de preconcentración sobre la señal analítica de amitrol.**

Condiciones de preconcentración: CNTPEs preparado con MWCNT largos, sumergido en disolución agitada de amitrol  $5,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  en medio tampón Britton-Robinson  $0,040 \text{ mol L}^{-1}$  a diferentes pH y a circuito abierto, tiempo de preconcentración: 180s. Condiciones de medida: tampón acetato  $0,050 \text{ mol L}^{-1}$  de pH 4.5. Velocidad de barrido  $50 \text{ mV s}^{-1}$ . Activación del electrodo: Realizando 75 ciclos entre  $-1,00$  y  $1,50 \text{ V}$  en tampón fosfato  $0,050 \text{ mol L}^{-1}$  de pH 7.4 a una velocidad de barrido de  $1,0 \text{ V s}^{-1}$ .

## B. Influencia de la concentración

Teniendo en cuenta el valor de pH óptimo para la preconcentración, pH 4.5, se comparan las señales obtenidas utilizando tampón Britton-Robinson y tampón acetato, ambos en concentración  $0,040 \text{ mol L}^{-1}$ . Utilizando tampón acetato la señal obtenida es aproximadamente el doble que la presentada en el tampón Britton-Robinson, en base a este resultado, se elige el tampón acetato como medio de preconcentración para posteriores estudios.

Para estudiar la influencia de la concentración del electrolito en la preconcentración, se preparan disoluciones de amitrol  $5,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  en tampón acetato de pH 4.5, y concentración variable. La preconcentración se realiza a circuito abierto y con agitación durante 180 s.

Se registran los voltamperogramas de barrido lineal entre 600 y 1100 mV en una disolución de tampón acetato 0.050 mol L<sup>-1</sup> de pH 4.5.

En la tabla 45 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 45.- Influencia de la concentración del tampón de preconcentración en la señal anódica de amitrol.

<b>Tampón acetato (mol L<sup>-1</sup>)</b>	<b>I<sub>p</sub> (μA)</b>	<b>E<sub>p</sub> (mV)</b>
<b>0.012</b>	1.6	884
<b>0.025</b>	1.5	877
<b>0.050</b>	1.9	866
<b>0.075</b>	1.9	850

Se puede observar que al aumentar la concentración del tampón, aumenta la intensidad de pico y el potencial de pico disminuye ligeramente. A la vista de los resultados obtenidos, se elige como electrolito de preconcentración tampón acetato 0.050 mol L<sup>-1</sup> de pH 4.5 para posteriores estudios, con el fin de que el medio de preconcentración y medida sea el mismo.

### **C. Influencia del tiempo de preconcentración**

Para evaluar la influencia del tiempo de preconcentración o acumulación ( $t_a$ ), se sumerge el electrodo durante diferentes tiempos, entre 0 y 600 s en la disolución agitada de amitrol, en medio acetato 0.050 mol L<sup>-1</sup> de pH 4.5 a circuito abierto. La medida se realiza en las condiciones de los apartados anteriores.

El estudio se realiza a dos concentraciones de amitrol,  $5.00 \times 10^{-5}$  y  $4.20 \times 10^{-6}$  molL<sup>-1</sup>.

La figura 107 muestra ejemplos de los voltamperogramas obtenidos a algunos de los tiempos de acumulación estudiados con la disolución de amitrol de concentración  $5.00 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>, junto con la influencia del tiempo de preconcentración en la intensidad de pico, a las dos concentraciones estudiadas.

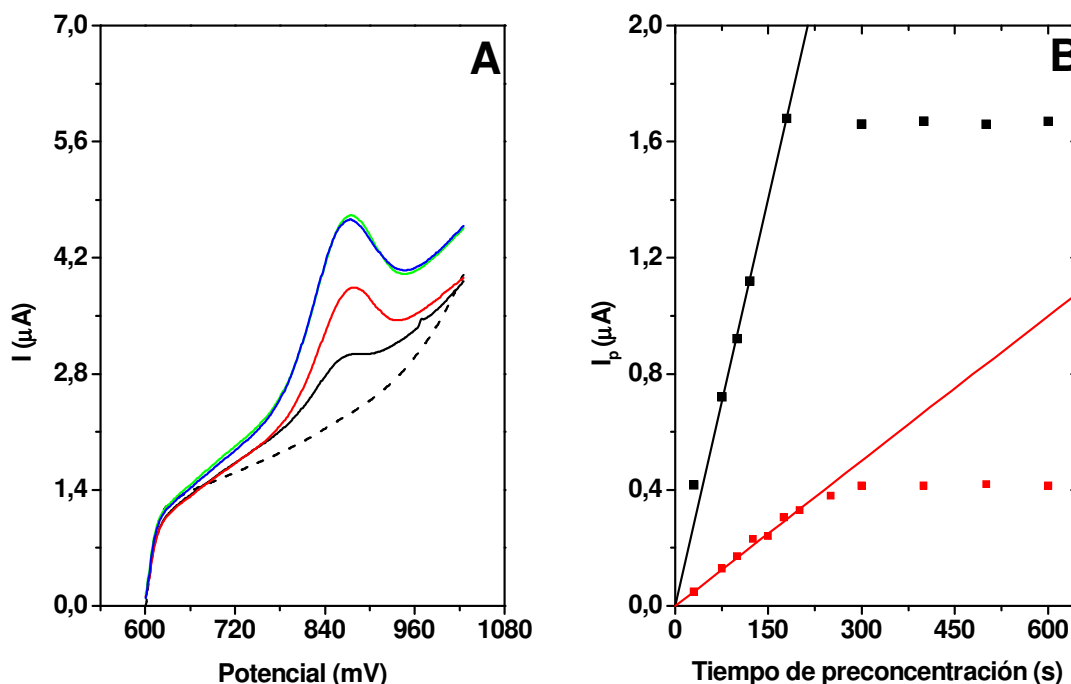


Figura 107.- Influencia del tiempo de preconcentración (A): 30 (—), 120 (—), 180 (—) y 300 s (—) Concentración de amitrol  $5.00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ . Evolución de la intensidad de pico de la señal anódica de amitrol con el tiempo de preconcentración (B) para dos concentraciones de amitrol:  $5.00 \times 10^{-5}$  (■) y  $4.30 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  (■) en acetato  $0.050 \text{ mol L}^{-1}$  de pH 4.5. Resto de condiciones igual que en figura 106.

En la figura 107 A se aprecia el aumento de la intensidad de pico con el aumento del tiempo de preconcentración. En la representación gráfica de la variación de la intensidad de pico con el tiempo de preconcentración, figura 107 B, puede observarse que la intensidad de pico varía linealmente con el tiempo de preconcentración hasta un tiempo en el que alcanza un valor máximo a partir del cual permanece constante. Este hecho indica que se ha producido la saturación de la superficie del electrodo de trabajo. El tiempo necesario para que se produzca la saturación es diferente para cada una de las concentraciones, siendo lógicamente mayor a menor concentración.

En la tabla 46 se muestran la ecuaciones del ajuste de las rectas de la evolución de la intensidad de pico con el tiempo de preconcentración, obtenidas para las dos concentraciones de amitrol estudiadas, junto con el tiempo de saturación para cada una de ellas.



Tabla 46.- Evolución de la intensidad de pico de la señal anódica de amitrol con el tiempo de preconcentración y tiempo de saturación de la superficie a diferentes concentraciones de amitrol

[Amitrol] mol L <sup>-1</sup>	Ecuación recta, r, n	t <sub>a</sub> (s)
5.0 x 10 <sup>-5</sup>	$I_p (\mu A) = (9.4 \pm 0.2) \times 10^{-3} t_a (s), r = 0.996, n = 5$	180
4.3 x 10 <sup>-6</sup>	$I_p (\mu A) = (1.7 \pm 0.1) \times 10^{-3} t_a (s), r = 0.994, n = 8$	300

#### D. Influencia del potencial de preconcentración

El estudio de la influencia del potencial de preconcentración o acumulación, sobre la señal voltamperométrica de amitrol, se realiza en las mismas condiciones que el apartado anterior, aplicando un potencial durante la preconcentración, para una concentración de amitrol 5.00 x 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup>. El tiempo de preconcentración es de 300 s.

En la figura 108 A se muestra la variación de la intensidad de pico con el potencial de preconcentración. Se observa que la intensidad de pico permanece prácticamente constante para valores de potencial comprendidos entre -200 y 250 mV. A potenciales superiores a 250 mV la intensidad aumenta hasta alcanzar un máximo a 500 mV y a potenciales superiores a éste, la señal de amitrol disminuye rápidamente. No se observa señal alguna a un potencial de 800 mV, algo lógico teniendo en cuenta que a este potencial se produce la oxidación del herbicida.

En la figura 108 B se muestra la señal obtenida preconcentrando durante 300 s a circuito abierto, frente a la señal obtenida preconcentrando el mismo tiempo y aplicando un potencial de acumulación de 500 mV. A la vista de los resultados, y dada la mejora obtenida, aplicando un potencial durante la preconcentración, se opta por realizar la preconcentración a 500 mV en todos los estudios posteriores.

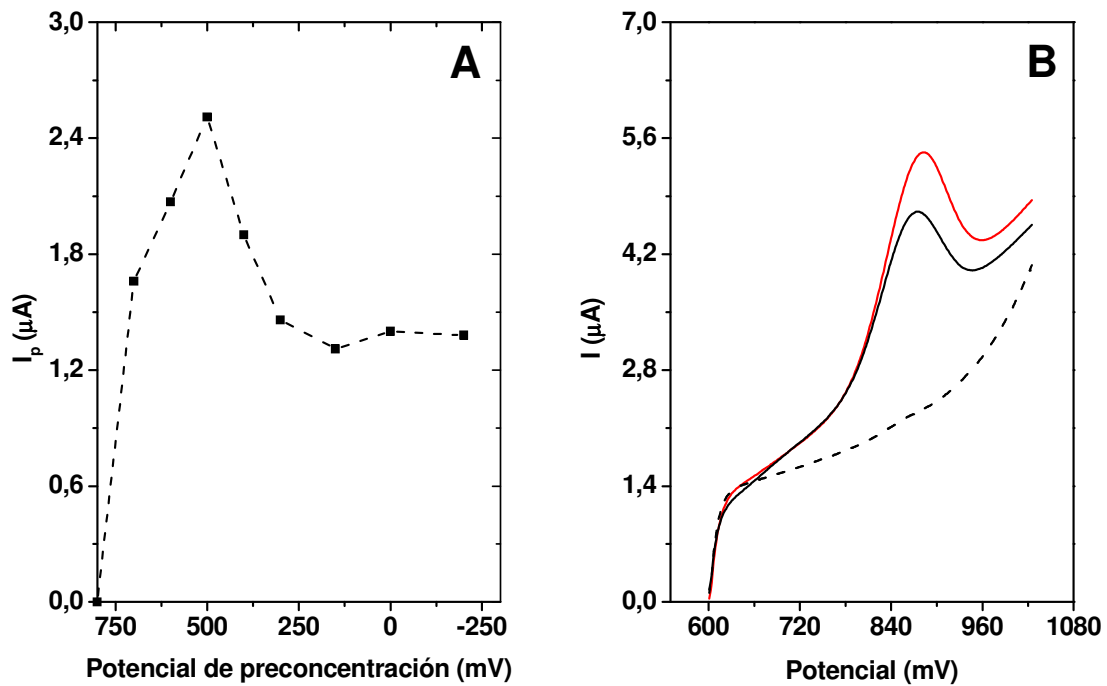


Figura 108.- Influencia del potencial de preconcentración en la intensidad de pico (A). Voltamperogramas obtenidos preconcentrando durante 300 s en disolución agitada de amitrol  $5,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  en tampón acetato  $0,050 \text{ mol L}^{-1}$  de pH 4.5 (B) a circuito abierto (—) y aplicando un potencial de 500 mV (---). Resto de condiciones igual que en figura 106.

Resumiendo, las condiciones óptimas de preconcentración son:

- Electrolito de preconcentración: tampón acetato  $0,050 \text{ mol L}^{-1}$  de pH 4.5.
- Tiempo de preconcentración: 300 s.
- Potencial de preconcentración: 500 mV.
- Velocidad de agitación: 300 rpm.

### 5.2.6. INFLUENCIA DEL TIEMPO DE EQUILIBRADO

Bajo las condiciones óptimas de preconcentración establecidas en el estudio anterior, y antes de realizar el estudio de la influencia de la concentración de amitrol, se evalúa la influencia de la aplicación de un tiempo de equilibrado antes de la medida. Para ello se realizan diferentes análisis variando el tiempo de equilibrado entre 0 y 80 segundos.

En la tabla 47 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 47.- Influencia del tiempo de equilibrado en la señal anódica de amitrol.

Tiempo de equilibrado (s)	$I_p$ ( $\mu A$ )	$E_p$ (mV)
0	2,1	863
2	2.2	875
5	2.3	871
10	2,5	866
20	2,5	873
40	1,9	883
80	1,9	862

Datos obtenidos de la media de tres análisis

No se observan grandes diferencias entre los voltamperogramas obtenidos a los diferentes tiempos de espera. En base a los resultados se selecciona un tiempo de espera de 10 s para posteriores estudios.

Una vez finalizado este estudio, quedan establecidas las condiciones óptimas para el análisis de amitrol por voltamperometría de adsorción-redisolución empleando un electrodo de pasta de nanotubos de carbono. Estas condiciones se encuentran resumidas en la tabla 48.

Tabla 48.- Condiciones óptimas para el análisis de amitrol por voltamperometría de adsorción-redisolución empleando un electrodo de pasta de nanotubos de carbon.

<b>ELECTRODO</b>	<b>Preparación</b>	Mezcla de MWCNTs largos y aceite mineral en proporción 50:50
	<b>Activación</b>	<u>Potenciodinámica</u> : en tampón fosfato 0.050 mol L <sup>-1</sup> de pH 7.4, aplicando 75 ciclos entre -1.0 y 1.5 V a 1.0 V s <sup>-1</sup>
<b>PRECONCENTRACIÓN</b>	<b>Electrolito de preconcentración</b> : tampón acetato 0.050 mol L <sup>-1</sup> de pH 4.5. <b>Tiempo de preconcentración</b> : 300 s <b>Potencial de preconcentración</b> : 500 mV <b>Velocidad de agitación</b> : 300 rpm	
<b>MEDIDA</b>	<b>Medio de medida</b> : tampón acetato 0.050 mol L <sup>-1</sup> de pH 4.5	
	<b>Técnica</b> : voltamperometría de barrido lineal.	Barridos entre 600 y 1050 mV. Velocidad de barrido: 50 mV s <sup>-1</sup> . Tiempo de equilibrado: 10 s

### 5.2.7 INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE AMITROL

Para la realización de este estudio se preparan disoluciones de amitrol en concentración comprendida entre  $5.0 \times 10^{-7}$  y  $1.00 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> en tampón acetato 0.050 mol L<sup>-1</sup> de pH 4.5. Estas disoluciones se analizan bajo las condiciones óptimas de preconcentración y medida descritas en la tabla 48.

Los voltamperogramas registrados, así como la variación de la intensidad de pico con la concentración, se muestran en la figura 109.

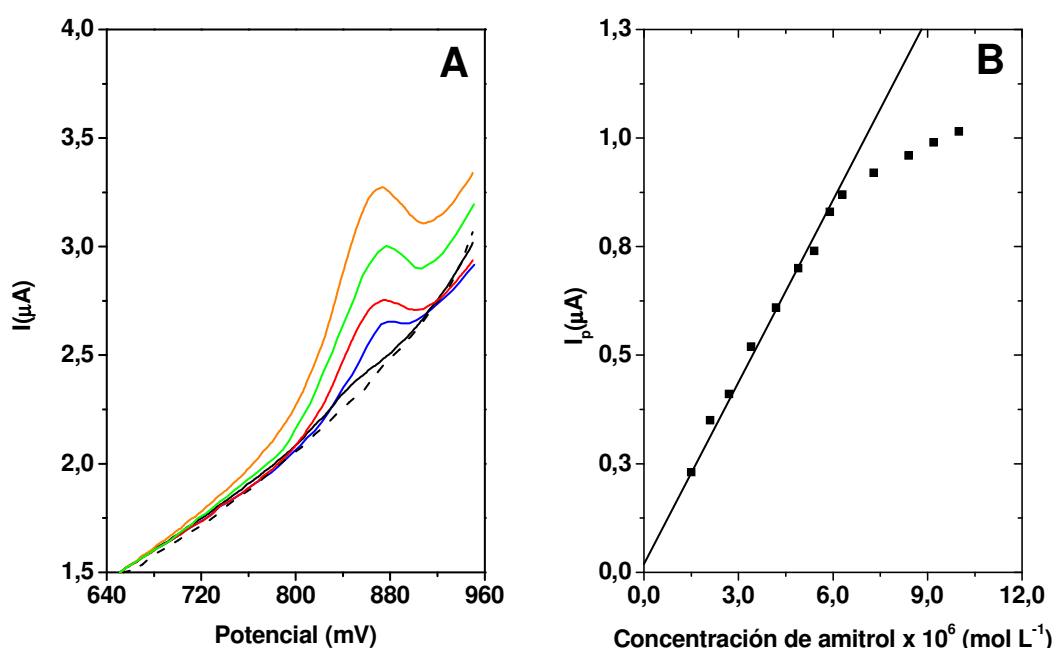


Figura 109.- Voltamperogramas obtenidos a diferentes concentraciones de amitrol (A):  $5.0 \times 10^{-7}$  (—),  $1.50 \times 10^{-6}$  (—),  $2.00 \times 10^{-6}$  (—),  $4.00 \times 10^{-6}$  (—) y  $5.50 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> (—) junto con el obtenido para una disolución blanco (línea discontinua). Influencia de la concentración en la intensidad de pico (B). Condiciones óptimas de preconcentración y medida.

La intensidad de pico muestra variación lineal con la concentración para concentraciones entre  $1.5 \times 10^{-6}$  y  $7.00 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>, con una ecuación de regresión:

$$I_p (\mu\text{A}) = (0.03 \pm 0.02) + (1.37 \pm 0.04) \times 10^5 C (\text{mol L}^{-1}), r = 0.996, (n=9), s_{xy} = 0.0260.$$

La sensibilidad alcanzada en este análisis es superior a la alcanzada empleando la voltamperometría de barrido lineal con un electrodo de “*glassy carbon*”, algo lógico teniendo en cuenta que en este estudio se emplea la voltamperometría de adsorción-redisolución.

Dividiendo las sensibilidades obtenidas en ambos estudios (LSV y AdSV) por el área física del electrodo de trabajo empleado en cada uno de ellos, se comprueba que la sensibilidad en la determinación de amitrol empleando la voltamperometría de adsorción-redisolución con un CNTPE fabricado con MWCTNs largos es 80 veces mayor que la obtenida por voltamperometría de barrido lineal empleando un electrodo de “*glassy carbon*”.

### **A. Cálculo de los límites de detección y determinación**

En este estudio, debido a la variabilidad en la corriente de fondo obtenida en el análisis, los límites de detección y de determinación se evalúan matemáticamente a partir de la desviación del ajuste de la ecuación de regresión ( $s_{x/y}$ ) siguiendo el procedimiento descrito por **Miller and Miller**<sup>88</sup>. Según éste, el valor de  $s_{x/y}$  obtenido en el ajuste por mínimos cuadrados puede aproximarse al valor de la desviación estándar de la señal del blanco.

El límite de detección obtenido a partir de  $3s_{x/y}$  resulta ser  $6.0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  ( $50 \mu\text{g L}^{-1}$ ), y el límite de determinación obtenido a partir de  $10s_{x/y}$ ,  $1,9 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  ( $160\mu\text{g L}^{-1}$ ).

La estimación experimental del límite de detección se lleva a cabo realizando la preconcentración y posterior análisis de diferentes disoluciones de amitrol en concentración comprendida entre  $4.0 \times 10^{-7}$  y  $1.00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ , comprobando que es posible detectar amitrol empleando este procedimiento al nivel de concentración  $6.0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  ( $50 \mu\text{g L}^{-1}$ ) de amitrol.

### 5.2.8 REPETITIVIDAD DEL ANÁLISIS

Para comprobar la repetitividad del análisis, se prepara un CNTPE y se activa según el procedimiento puesto a punto. Una vez realizada la medida por voltamperometría de adsorción-redisolución sobre una disolución de amitrol  $3.00 \times 10^{-6}$ , y sin volver a activar, se repite sucesivamente el procedimiento veinte veces. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 49

Tabla 49.- Evolución de la señal anódica de amitrol sobre un CNTPE con el numero de análisis

Nº Análisis	I <sub>p</sub> (µA)	E <sub>p</sub> (mV)
1	0.43	863
2	0.47	883
3	0.42	870
4	0.44	868
5	0.42	871
6	0.46	872
7	0.44	869
8	0.45	865
9	0.42	866
10	0.42	875
11	0.47	871
12	0.42	868
13	0.44	863
14	0.44	882
15	0.43	871
16	0.46	864
17	0.46	873
18	0.45	888
19	0.48	872
20	0.42	862
<b>DER (%)</b>	<b>4.3</b>	<b>0.8</b>

La buena precisión obtenida en los análisis indica la alta efectividad del proceso de oxidación para redissolver el amitrol adsorbido en el CNTPE.

### 5.2.9 ESTABILIDAD DE LOS ELECTRODOS

Con el fin de comprobar la estabilidad de los CNTPEs empleados en este estudio, se repite la determinación de amitrol según el procedimiento analítico puesto a punto, con una disolución del herbicida en concentración  $3.00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ , durante 10 días empleando el mismo CNTPE. Después de cada análisis, el CNTPE se lava con agua destilada y se deja al aire durante 24 h, hasta la siguiente medida.

En la tabla 50 se muestran los resultados obtenidos

Tabla 50.- Estabilidad de los CNTPEs

Nº de día	$I_p$ ( $\mu\text{A}$ )	$E_p$ (mV)
1	0.44	863
2	0.48	873
3	0.40	888
4	0.46	865
5	0.44	866
6	0.49	869
7	0.42	871
8	0.40	869
9	0.44	868
10	0.41	872
<b>DER (%)</b>	<b>7.2</b>	<b>0.8</b>

Estos resultados ponen de manifiesto la alta estabilidad que presentan los CNTPEs.



### 5.2.10 ESTUDIO DE INTERFERENCIAS

Puesto que el urazol ha sido identificado como el principal producto de degradación fotoquímica de amitrol en disolución acuosa<sup>69</sup>, y también, como uno de los productos de degradación del herbicida en suelos y plantas de manzano a niveles menores o iguales al 2 % del producto inicial<sup>70</sup>, se hace necesario estudiar el efecto que en la señal analítica de amitrol pueda tener la presencia de urazol en el medio.

Se realiza la preconcentración con una disolución de amitrol en concentración  $5.00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  y en una disolución de amitrol en la misma concentración y urazol en concentración  $2.0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ , concentración esperada de urazol como consecuencia de la degradación de amitrol en base a los estudios descritos en la bibliografía<sup>70</sup>.

En la figura 110 se muestran los voltamperogramas obtenidos, en ambos casos. Se observa que, la señal analítica de amitrol no se ve afectada por la presencia de urazol, siendo posible la determinación de amitrol en presencia de urazol en estas condiciones, sin la necesidad de una separación previa.

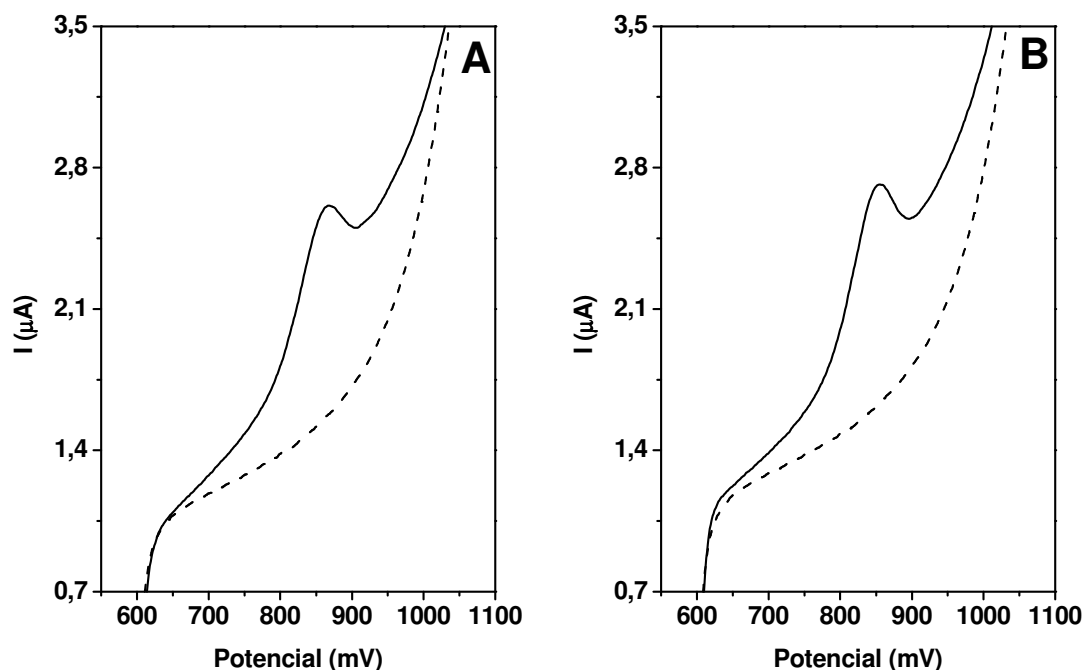


Figura 110.- Voltamperogramas obtenidos para una disolución de amitrol  $5.00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  (A), y para una disolución de amitrol en igual concentración en presencia de urazol en concentración  $2.0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ . Condiciones de preconcentración y medida óptimas.

### 5.2.11 DETERMINACIÓN DE AMITROL EN MUESTRAS DE AGUA

Una vez comprobada la alta sensibilidad y selectividad de los CNTPEs en la determinación de amitrol, se estudia su aplicabilidad al análisis de amitrol en muestras de agua de consumo (grifo) y en agua del río Alberche.

Se analizan muestras de agua sin dopar, con el fin de comprobar la presencia del herbicida. Posteriormente se analizan muestras de agua dopadas a diferentes niveles de concentración de amitrol.

Se estudia la determinación directa de amitrol utilizando un tratamiento de muestra muy simple. Dicho tratamiento consta únicamente de un paso de filtrado y ajuste del medio de trabajo adecuado.

La figura 111 muestra los voltamperogramas obtenidos para una muestra de agua del río Alberche y una muestra del mismo agua previamente dopada con amitrol en concentración  $3.00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  ( $0.25 \text{ mg L}^{-1}$ ). Como puede observarse en la figura, el agua de río no contiene amitrol al nivel de concentración detectable con la metodología puesta a punto.

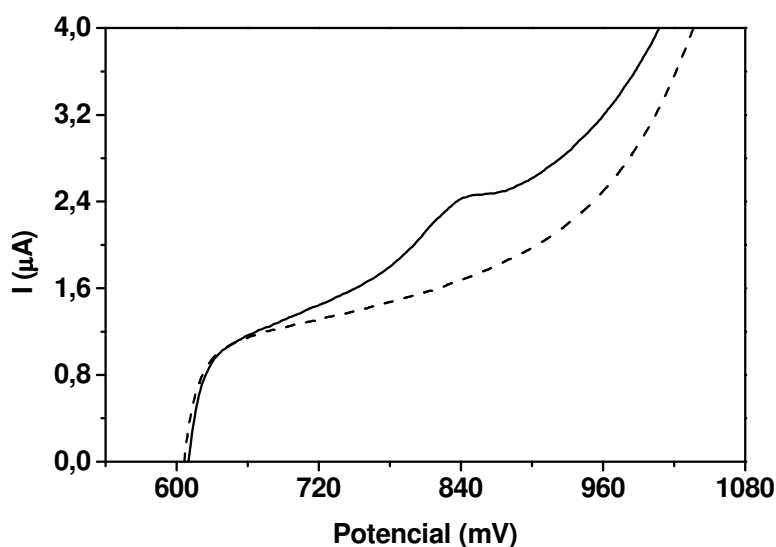


Figura 111.-Voltamperogramas obtenidos para una muestra de agua del río Alberche (línea discontinua) y una muestra de agua del río Alberche dopada con amitrol  $3.00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  (línea continua). Condiciones óptimas de preconcentración y medida.

Se utiliza el método de adición estándar para realizar la determinación de amitrol en los dos tipos de agua.

Para ello se dopan 50.0 mL de cada muestra de agua al nivel de concentración de amitrol de  $3.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ , se filtra y se toman alícuotas de 5.0 mL de las muestras. Se analizan bajo condiciones óptimas.

Una vez registrado el barrido anódico de las muestras, se realizan dos adiciones sucesivas de amitrol en concentración  $1.00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ .

En la figura 112 se muestra la respuesta obtenida para una muestra de agua del río Alberche dopada con amitrol en concentración  $3.00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  y las dos adiciones sucesivas de  $1.00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  de amitrol, junto con la evolución de la intensidad de pico con la concentración adicionada de amitrol.

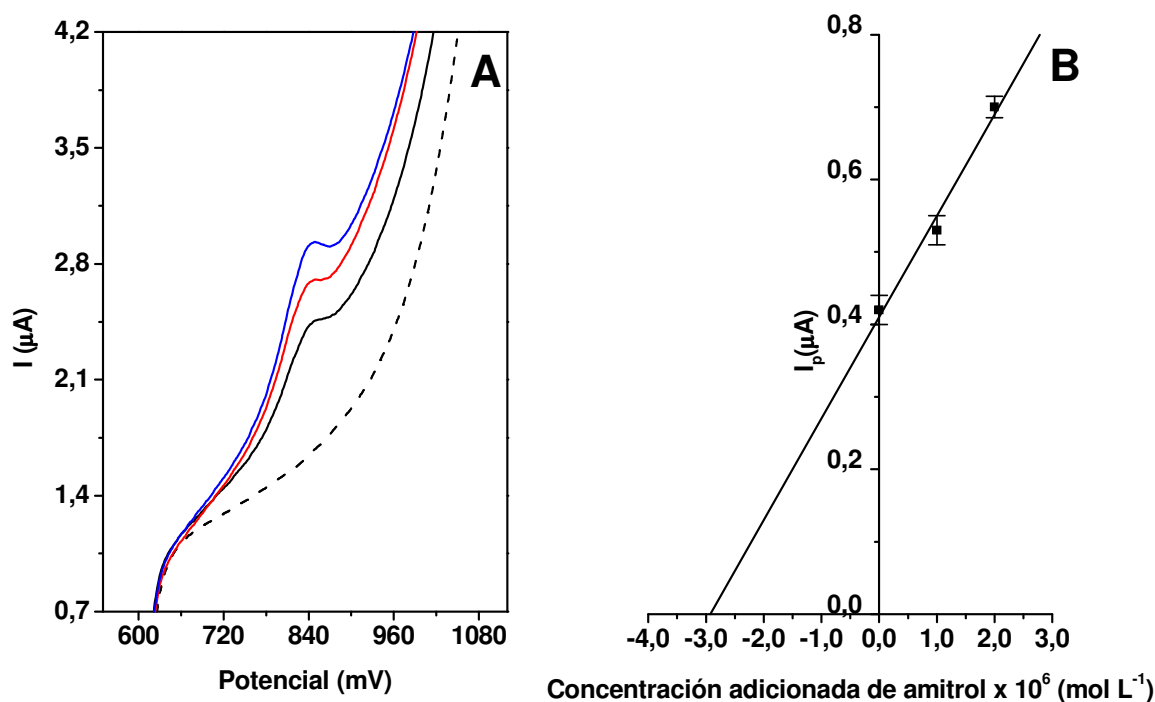


Figura 112.- Voltamperogramas obtenidos para: agua del río Alberche (discontinuo), agua del río Alberche dopada con amitrol en concentración  $3.00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  (—) y dos adiciones sucesivas de amitrol en concentración  $1.00 \times 10^{-6}$  (—) y  $2.00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  (—) respectivamente (A). Evolución de la intensidad de pico con la concentración adicionada de amitrol. Condiciones óptimas de preconcentración y medida.

En la tabla 51 se recogen las ecuaciones de ajuste lineal con sus desviaciones estándar correspondientes, los valores de concentración (C) obtenidos, y los errores relativos (Er) calculados para cada muestra.

Tabla 51.- Parámetros de calibración y errores relativos obtenidos en la determinación de amitrol en aguas.

Muestra	Pendiente	Ordenada	r	C (mol L <sup>-1</sup> )	E <sub>r</sub> %
Agua de río	(1.29±0.06)×10 <sup>5</sup>	(0.40 ± 0.02)	0.995	3,1 x 10 <sup>-6</sup>	3.3
	(1.31±0.04)×10 <sup>5</sup>	(0.42 ± 0.01)	0.997	3.2 x 10 <sup>-6</sup>	6.6
	(1.24±0.07)×10 <sup>5</sup>	(0.39 ± 0.03)	0.993	3.1 x 10 <sup>-6</sup>	3.3
Agua de grifo	(1.26± 0.08)×10 <sup>5</sup>	(0.41 ± 0.02)	0.996	3.2 x 10 <sup>-6</sup>	6.6
	(1.29±0.03)×10 <sup>5</sup>	(0.38 ± 0.04)	0.994	2.9 x 10 <sup>-6</sup>	3.3
	(1.28±0.04)×10 <sup>5</sup>	(0.42± 0.02)	0.993	3.3 x 10 <sup>-6</sup>	10

Pendiente,  $\mu\text{A L mol}^{-1}$ , ordenada,  $\mu\text{A}$ ; n=3; Concentración puesta:  $3.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$

Las sensibilidades en ambas muestras son similares a las obtenidas en los análisis realizados con muestras de agua destilada, lo que indica que la matriz de las muestras reales no compromete el rendimiento de los CNTPEs en la determinación de amitrol.

## **6. CONCLUSIONES**



Parte de los resultados obtenidos y reflejados en esta Memoria han dado lugar hasta el momento, a tres publicaciones en revistas de carácter internacional y una publicación nacional, mostradas en el capítulo 8.

En este capítulo se recogen las conclusiones generales del trabajo de investigación realizado en la Memoria.

## **PRIMERA**

Se ha puesto a punto un método de separación, identificación y determinación de amitrol e hidroxiatrazina por electroforesis capilar de zona con detección UV. Se han optimizado todos y cada uno de los parámetros que afectan a la separación y a la detección. La separación se realiza con tampón fosfato  $0.020 \text{ mol L}^{-1}$  de pH 3.2. Los coeficientes de difusión calculados son  $2.5 \times 10^{-5}$  para el amitrol y  $1.5 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  para la hidroxiatrazina.

Bajo condiciones óptimas de separación, el valor de la movilidad del flujo electrosmótico es despreciable frente a los valores de las movilidades electroforéticas de los compuestos. La movilidad electroforética de amitrol es  $4.5 \times 10^{-4}$  y la de la hidroxiatrazina  $3.2 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .

Las sensibilidades obtenidas en la determinación por CZE-UV son  $1.27 \text{ } \mu\text{A L mg}^{-1}$ , para el amitrol y  $0.96 \text{ } \mu\text{A L mg}^{-1}$  para la hidroxiatrazina. Los límites de detección alcanzados para amitrol e hidroxiatrazina son  $90$  y  $120 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  respectivamente.

## **SEGUNDA**

La metodología analítica optimizada se ha empleado en el seguimiento de procesos de degradación de amitrol y atrazina en diferentes medios degradativos, y diferentes condiciones de fotodegradación.

El amitrol es químicamente estable en  $\text{NaOH } 1.0 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $\text{HCl } 1.0 \text{ mol L}^{-1}$ , tampón fosfato de pH 7.0 y  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30% y es estable a la fotodegradación en disolución acuosa.

La atrazina es degradada a hidroxiatrazina al cabo de 24 h en medio  $\text{NaOH } 1.0 \text{ mol L}^{-1}$  y  $\text{HCl } 1.0 \text{ mol L}^{-1}$ , y permanece estable en medio tampón fosfato de pH 7.0 y  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30%).

Además, es degradada al cabo de 24 h cuando es expuesta a luz UV y a partir de los 10 días cuando es expuesta a luz solar.

Por otra parte, el método ha sido aplicado para la determinación de amitrol en muestras de agua de consumo (grifo) y agua de río. La muestra se preconcentra por evaporación, consiguiendo factores de preconcentración de 25 veces. Se detecta amitrol al nivel de  $5 \mu\text{g L}^{-1}$ , con errores relativos inferiores al 5.3% ( $n=6$ ).

## TERCERA

Se ha desarrollado un nuevo método para la separación, identificación y determinación de amitrol y su metabolito, urazol, por electroforesis capilar de zona con detección dual UV/amperométrica. La separación se realiza en tampón acetato  $0.030 \text{ mol L}^{-1}$  de pH 4.5. Bajo las condiciones óptimas establecidas se ha calculado una movilidad del flujo electrosmótico de  $5.1 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , y unas movilidades electroforéticas de  $1.0 \times 10^{-4}$  para el amitrol y de  $-0.7 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$  para el urazol.

La detección amperométrica tiene mayores sensibilidades y menores límites de detección que la detección UV. Los límites de detección para amitrol son  $45$  y  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  y para urazol de  $85$  y  $110 \mu\text{g L}^{-1}$  empleando la detección amperométrica y la detección UV respectivamente.

## CUARTA

El método anterior ha sido aplicado con éxito en la determinación de los compuestos de interés en muestras de manzana y de agua mineral.

Para la determinación de amitrol y urazol en manzanas, los analitos son extraídos previamente por dispersión de matriz en fase sólida (MSPD), optimizándose el proceso de extracción. Las recuperaciones obtenidas son del  $(87 \pm 5) \%$  ( $n=4$ ) para amitrol y  $(90 \pm 10) \%$  ( $n=4$ ) para urazol. Con la metodología desarrollada es posible detectar amitrol y urazol en muestras de manzana al nivel de  $0.4 \mu\text{g g}^{-1}$ .



Para la determinación de los analitos en el agua mineral se ha puesto a punto un proceso de preconcentración por evaporación, con factor de preconcentración de 100, y recuperaciones para amitrol del  $(83\pm 9)\%$  ( $n=3$ ) y del  $(70\pm 8)\%$  ( $n=3$ ) para el urazol. Se detecta amitrol al nivel de  $0.6\ \mu\text{g L}^{-1}$  y urazol al nivel de  $1.0\ \mu\text{g L}^{-1}$ .

## QUINTA

Los estudios electroquímicos de amitrol realizados en electrodo de “*glassy carbon*” muestran que el amitrol presenta una única onda de oxidación (Ox1) irreversible para valores de pH inferiores a 8.5. A valores superiores a éste, el amitrol presenta dos ondas de oxidación (Ox1 y Ox2) también irreversibles. Además, se observa la presencia de un par redox (Red3/Ox3) en todo el margen de pH estudiado.

Los estudios realizados por voltamperometría cíclica en ácido fosfórico  $0.026\ \text{mol L}^{-1}$  indican que, el amitrol presenta una onda de oxidación (Ox1), tras la cual se da una reacción química acoplada que genera producto/s electroactivos responsables del par redox posterior (Red3/Ox3). El proceso de oxidación correspondiente a la onda Ox1 está controlado por difusión en el rango de concentraciones de amitrol comprendido entre  $1.00$  y  $9.40 \times 10^{-4}\ \text{mol L}^{-1}$  y bajas velocidades de barrido. En la etapa limitante de la velocidad está involucrado un protón y un electrón.

Por voltamperometría de barrido lineal es posible llevar a cabo la detección y determinación de amitrol. La intensidad de pico varía linealmente con la concentración de amitrol a las velocidades de barrido estudiadas. Para una velocidad de barrido de  $50\ \text{mV s}^{-1}$ , se obtiene una sensibilidad de  $(4.2\pm 0.1) \times 10^4\ \mu\text{A L mol}^{-1}$ , para concentraciones de amitrol inferiores a  $6.80 \times 10^{-4}\ \text{mol L}^{-1}$ , siendo el límite de detección  $1.1 \times 10^{-5}\ \text{mol L}^{-1}$  ( $0.92\ \text{mg L}^{-1}$ ) y el límite de determinación  $3.6 \times 10^{-5}\ \text{mol L}^{-1}$  ( $3.0\ \text{mg L}^{-1}$ ).

## SEXTA

En los estudios coulombimétricos se concluye que, el número de electrones involucrados en el proceso de oxidación global de amitrol es de 4, y alguno/s de los producto/s generados en el proceso, bajo las condiciones del estudio, son gases. Se ha identificado  $\text{CO}_2$  e ión amonio como productos de las electrolisis.

## SEPTIMA

Los estudios electroquímicos de amitrol, con electrodo rotatorio de “*glassy carbon*” en medio ácido fosfórico  $0.026 \text{ mol L}^{-1}$ , indican la existencia de una componente cinética en la reacción electródica de amitrol bajo las condiciones del estudio. Se ha estimado el valor de la constante de velocidad heterogénea del proceso ( $k_h$ ), a 1500 mV, resultando un valor de  $1.5 \times 10^{-2} \text{ cm s}^{-1}$ . También se ha calculado el valor de la constante heterogénea estándar condicional de velocidad del proceso electródico ( $k^0$ ) cuyo valor obtenido es de  $2.7 \times 10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$ , y el valor de  $\beta n_{\beta}$ , 0.41, para una concentración de amitrol de  $5.00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ , éste último, valor similar al obtenido en régimen estacionario. El coeficiente de difusión del amitrol en ácido fosfórico  $0.026 \text{ mol L}^{-1}$  es de  $(1.6 \pm 0.3) \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ . Y por último se ha comprobado que existe una relación lineal entre la intensidad límite, medida a 1500 mV, y la concentración de amitrol a las dos frecuencias de rotación estudiadas (1000 y 3000 rpm), lo que permitiría la utilización de esta técnica para la determinación de amitrol.

## OCTAVA

Se ha propuesto un mecanismo de oxidación de amitrol en medio ácido fosfórico  $0.026 \text{ mol L}^{-1}$  que conlleva un primer paso, en el cual, el amitrol es oxidado a un radical con la pérdida de un electrón y un protón. Este radical, en las concentraciones empleadas, puede hidrolizarse y oxidarse dando lugar a diferentes especies intermedias y finalmente  $\text{CO}_2$ ,  $\text{NH}_4^+$  y otros productos no identificados.

## NOVENA

Con objeto de desarrollar un método diferente a la evaporación que permita la preconcentración de amitrol en aguas, y dado que es un compuesto altamente polar, se ha estudiado la formación de un par iónico con dodecil sulfato sódico (SDS) para hacer posible su retención en cartuchos de extracción en fase inversa  $\text{C}_{18}$ .

En la etapa de elución se arrastra parte del SDS, pero se ha comprobado que su presencia en el medio de medida facilita la transferencia electrónica, bajando el potencial y mejorando la sensibilidad.

Todos los estudios se realizan con aguas dopadas empleando el método de adición estándar; se han optimizado los diferentes parámetros que influyen en el proceso de extracción para obtener recuperaciones próximas al 100%. Con 200 mL de muestra de agua de río, es posible preconcentrar 100 veces la muestra y llegar a límites de detección de  $7 \mu\text{g L}^{-1}$ , por voltamperometría de barrido lineal.

## DÉCIMA

Se han preparado sensores electroquímicos para amitrol empleando nanotubos de carbono cortos y largos y aceite mineral en proporción 50:50. Al activar potenciodinámicamente los sensores, se observa un efecto catalítico que facilita la reacción de oxidación anódica bajando marcadamente el potencial.

En electrodos de pasta de nanotubos de carbono largos se ha estudiado la determinación de amitrol por voltamperometría de adsorción-redisolución, optimizando cada uno de los parámetros que afectan a las etapas de preconcentración y medida. Preconcentrando en tampón acetato  $0.050 \text{ mol L}^{-1}$  de pH 4.5, durante 300 s a 500 mV, se ha conseguido una sensibilidad de  $1.37 \times 10^5 \mu\text{A L mol}^{-1}$ , 80 veces mayor que la obtenida por voltamperometría de barrido lineal empleando el electrodo de "glassy carbon". El método permite, con éxito, la determinación directa de amitrol en agua de grifo y de río, con errores relativos inferiores al 10% para muestras de agua dopadas con amitrol en concentración  $3.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ .



## **7. BIBLIOGRAFÍA**



## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Claudio Barberá, **"Pesticidas Agrícolas"**, OMEGA, S. A., 4ª ed., Barcelona, 1989.
2. Juan I. Yagüe González, Ángel Yagüe Martínez de Tejada, **"Guía Práctica de Productos Fitosanitarios, 2006"**, Gowan Española Fitosanitarios S. L., Barcelona, 2005.
3. Ramón Coscolla, **"Residuos de plaguicidas en alimentos vegetales"**, Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, 1993.
4. Atienza, J.; Herguedas, A.; Jiménez, J. J.; Sanz, M.; Álvarez-Benedí, J. **"Plaguicidas. Aspectos ambientales, analíticos y toxicológicos"**, Morell, Ignacio; Candela, Lucila (eds.), Publicacions de la Universitat Jaume I, Castellon de la Plana (España), 1998.
5. Directiva 91/414/CEE del Consejo, de 15 de Julio de 1991, Diario Oficial de las Comunidades Europeas.
6. [www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc158.htm](http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc158.htm)
7. <http://extoxnet.orst.edu/pips/amtrole.htm>.
8. "Cláusula de Delaney", sección 409 (21. U.S.C. 348(c)(3)(A)). The food Additives Amendment of 1958 (FFDCA)
9. U. S. Environmental Protection Agency. **"Amitrole; preliminary determination to terminate special review"**. Federal Register 57 (196), 46448, 1992 (Oct 8).
10. Directiva 2001/21/CE de la Comisión de 5 de marzo de 2001, Diario Oficial de las Comunidades Europeas, L69/17.
11. [www.epa.gov/nps/agmm/chap4b.pdf](http://www.epa.gov/nps/agmm/chap4b.pdf)
12. Sund, K. A., **"Residual activity of 3-amino-1,2,4-triazole in soils"**, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (1956), 4, 57-60.
13. Nearpass, D. C., **"Exchange adsorption of 3-amino-1,2,4-triazole by an organic soil"**, *Soil Science Society of American Proceedings*, (1969), 33(4), 524-8.
14. Day, B. E.; Jordan, L. S.; Hendrixon, R. T., **"The decomposition of amitrole en California soils"**, *Weeds*, (1961), 9, 443-56.
15. Oesterreich, T.; Klaus, U.; Volk, M.; Neidhart, B.; Spiteller, M., **"Environmental fate of amitrole: Influence of dissolved organic matter"**, *Chemosphere*, (1999), 38 (2), 379-92.
16. Ashton, F. M. **"Fate of amitrole in soil"**, *Weeds*, (1963), 11(3), 167-70.
17. Campacci, E. F.; New, P. B.; Tchan, Y. T., **"Isolation of amitrole-degradation bacteria"**, *Nature*, (1977), 266(5598), 164-5.
18. Dakhel, N.; Barriuso, E.; Charnay, M.-P.; Touratier, C.; Ambrosi, D., **"Amitrole degradation in vineyard soils in relation to pedo-climatic conditions"**, *Biology and Fertility of Soils*, (2001), 33(6), 490-94.
19. Plimmer, J.R.; Kearney, P. C.; Kaufman, D. D.; Guardia, F. S., **"Amitrole decomposition by free radical generating systems and by soils"**, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (1967), 15(6), 996-9.
20. Kaufman, D. D.; Plimmer, J. R.; Kearney, P. C.; Blake, J.; Guardia, F. S., **"Chemical versus microbial decomposition of amitrole in soil"**, *Weed Science*, (1968), 16(2), 266-72.

21. [www.epa.gov/oppsrrd1/REds/0095red.pdf](http://www.epa.gov/oppsrrd1/REds/0095red.pdf)
22. C. R. Worthing and R. J. Hance (ed.) **"The pesticide manual"**, 9<sup>th</sup> ed. Farnham, Surrey, The British Crop Protection Council. Pp 25-26.
23. Jensen-Korte, U.; Anderson, C.; Spiteller, M., **"Photodegradation of pesticides in presence of humic substances"**, *Sci Total Environ.*, (1987), 62, 335-40.
24. <http://pmed.cce.cornell.edu/profiles/extoxnet/24d-captan/ amitrole-ext.html>.
25. Inniss, M. D., **"Immunity to cancer"**, *British medical journal*, (1969), 1(659), 765.
26. Feinstein, R.; Fry, R. J. M.; Staffeldt, E. F., **"Carcinogenic and antitumor effects of aminotriazole on acatalasemic and normal catalase mice"**, *Journal of the National Cancer Institute*, (1940-1978) (1978), 60(5), 1113-16.
27. <http://monographs.iarc.fr/ENG/classification/listagentsalphorder.pdf>.
28. Confederación Sindical de Comisiones Obreras. Editor: Instituto Sindical de Trabajo, Ambiente y Salud (ISTAS), Octubre 2002.
29. Keun J. C.; Sang, G. K.; Chang, W. K.; Seung, H. K., **"Effects of activated carbon types and serviced life on removal of endocrine disrupting chemical: amitrol, nonylphenol, and bisphenol-A"**, *Chemosphere*, (2005), 58, 1535-45.
30. Green, F. O.; Feinstein, R. N., **"Quantitative estimation of 3-Amino-1,2,4-triazole"**, *Analytical Chemistry*, (1957), 29, 1658-60.
31. Aldrich, F. D.; McLane, S. R. Jr., **"A paper chromatographic method for the detection of 3-amino-1,2,4-triazole in plant tissues"** *Plant Physiology*, (1957), 32(2), 153-4.
32. Storherr, R. W.; Burke, J., **"Determination of 3-amino-1,2,4-triazole in crops"**, *Journal of the Association of Official Agricultural Chemists.*, (1961), 44, 196-9.
33. Pribyl, J.; Herzel, F.; Schmidt, G., **"Contribution to the determination of aminotriazole residues"**, *Fresenius` Zeitschrift fuer Analytische Chemie*, (1978), 289(2), 81-5.
34. Alary, J.; Bourbon, P.; Escricut, C.; Vadaele, J., **"Spectrophotometric determination of guanazole and aminotriazole in waters from an aminotriazole production plant"**, *Environmental Technology Letters*, (1984), 6(2), 93-100
35. Racusen, D., **"Metabolism and translocation of aminotriazole in plants"**, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, (1958), 74, 106-13.
36. Agrawal, B. B. L.; Margoliash, E., **"A Spectrophotometric Method for the Determination of Aminotriazole and Other Aromatic Amines"**, *Analytical Biochemistry*, (1970), 34, 505-16.
37. Jaques, A., **"3-Amino-s-triazole (amitrole) (update)"**, *Analytical Methods for Pesticides and Pant Growth Regulators*, (1984), 13(Synth. Pyrethroids Other Pestic.), 191-5.
38. Van der Poll, J. M.; Vink, M.; Quirijns, J. K., **"Capillary gas chromatographic determination of amitrole in water with alkali ionization detection"**, *Chromatographia*, (1988), 25(6), 511-14.
39. Van der Poll, J. M.; Vink, M.; Quirijns, J. K., **"Determination of amitrole in plant tissues and sandy soils by capillary gas chromatography with alkali flame ionization detection"**, *Chromatographia*, (1990), 30(3-4), 155-8.
40. Lewalter, J.; Steiner, C.; Angerer, J., **"Amitrole (3-amino-1,2,4-triazole)"**, *Analysis of Hazardous Substances in Biological Materials*, (1999), 6, 63-77.



41. Lokke, H., “**Determination of amitrole by ion-pair high-performance liquid chromatography**”, *Journal of Chromatography*, (1980), 200, 234-7.
42. Archer, A. W., “**Determination of 3-amino-1,2,4-triazole (amitrole) in urine by ion-pair high-performance liquid chromatography**”, *Journal of Chromatography*, (1984), 303(1), 267-71.
43. Ternes, W.; Rüssel-Sinn, H. A., “**Determination of 3-amino-1,2,4-triazole (Amitrole) in tissues with electrochemical detection by ion-pair high-performance liquid chromatography**”, *Fresenius Z Analytical Chemistry*, (1987), 326, 757-9.
44. Dornseiffen, J. W.; Verwaal, W., “**Analysis of blackberries on contamination with amitrole used along railroad tracks**”, *Mededelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen, Universiteit Gent*, (1988), 53(3B), 1519-30.
45. Lochtman, J.; Gernikeites, T.; Hueskes, R., “**Determination of amitrole and asulam by HPLC**”, *Vom Hasser*, (1991), 77, 111-8.
46. Pachinger, A.; Eisner, E.; Begutten, H.; Klus, H., “**A simple method for the determination of amitrole in drinking and ground water**”, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, (1992), 342 (4-5), 413-5.
47. Bernwieser, I.; Sontag, G., “**HPLC with electrode array detection. Determination of amitrole in drinking and ground water**”, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, (1993), 347 (12), 499-501.
48. Pichon, V.; Hennion, M.-C., “**Comparison of online enrichment on ion-pair and cation-exchange liquid chromatography for the trace-level determination of 3-amino-1,2,4-triazole (aminotriazole) in water**”, *Analytical Chimica Acta*, (1993), 284(2), 317-26.
49. Meyer, A.; Henze, G., “**HPLC with amperometric detection for the determination of pesticides of high polarity. Quantification of amitrole**”, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, (1994), 349(8-9), 650-3.
50. Dugay, J.; Hennion, M.-C., “**Evaluation of the performance of analytical procedures for the trace-level determination of aminotriazole in drinking waters**”, *Trends in Analytical Chemistry*, (1995), 14(8), 407-14.
51. Kraeutler, O.; Dorn, E., “**HPLC-determination of amitrole in water**”, *Ernaehrung*, (1995), 19(2), 64-6.
52. García Sánchez, F.; Navas Díaz, A.; García Pareja, A.; Bracho, V., “**Liquid chromatographic determination of asulam and amitrole with pre-column derivatization**”, *Journal Liquid Chromatography & Related Technologies*, (1997), 20(4), 603-15.
53. Bobeldijk, I.; Broess, K.; Speksnijder, P.; Van Leerdam, T., “**Determination of the herbicide amitrole in water with pre-column derivatization, liquid chromatography and tandem mass spectrometry**”, *Journal of Chromatography A*, (2001), 938(1-2), 15-22.
54. Egawa, S.; Baba, T., “**Determination of amitrole in river and sea water**”, *Nagasaki-ken Eisei Kogai Kenkyushoho*, (2002), 47, 79-81.
55. Uebori, M., “**Determination of amitrole in environmental water samples by LC/MS/MS**”, *Kankyo Kagaku*, (2003), 13(2), 445-52.

56. Girod, M. Delaurent, C.; Charles, L.; “**Analysis of amitrole by normal-phase liquid chromatography and tandem mass spectrometry using a sheath liquid electrospray interface**”, *Rapid communications in mass spectrometry*, (2006), 20, 892-6.
57. Mezinger, F.; Schmitt-Kopplin, P.H.; Freitag, D.; Kettrup, A. “**Analysis of agrochemicals by capillary electrophoresis**”, *Journal of Chromatography, A* (2000), 891(1), 45-67.
58. Wechsler, K.; Rombourg, M.; Exinger, A.; Breuzin, C., “**Triazole electrophoresis possibilities and limits of the method**”, *Annales des Falsifications de l'Expertise Chimique et Toxicologique*, (1994), 87(924), 23-34.
59. Cho, Ri., “**Determination of amitrole in agricultural products by capillary electrophoresis**”, *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, (1999), 40(5), 396-400.
60. Chicharro, M.; Zapardiel, A.; Bermejo, E.; Sánchez, A., “**Simultaneous UV and electrochemical determination of the herbicide asulam in tap water samples by micellar electrokinetic capillary chromatography**”, *Analytica Chimica Acta*, (2002), 469(2), 243-52.
61. Takeda, S.; Fukushi, K.; Chayama, K.; Nakayama, Y.; Tanaka, Y.; Wakida, S.-I., “**Simultaneous separation and on-line concentration of amitrole and benzimidazole pesticides by capillary electrophoresis with a volatile migration buffer applicable to mass spectrometric detection**” *Journal Chromatography A*, (2004), 1051(1-2), 297-301.
62. Zen, J.-M.; Kumar, A. S.; Chang, M.-R., “**Electrocatalytic oxidation and trace detection of amitrole using a Nafion/lead-ruthenium oxide pyrochlore chemically modified electrode**”, *Electrochimica Acta*, (2000), 45(10), 1691-9.
63. Zen, J.-M.; Chen, H.-P.; Kumar, A. S., “**Disposable clay-coated screen-printed electrode for amitrole analysis**”, *Analytica Chimica Acta*, (2001), 449(1-2), 95-102.
64. Chicharro, M.; Zapardiel, A.; Bermejo, E.; Moreno, M.; Madrid, E., “**Electrocatalytic amperometric determination of amitrol using a cobalt-phthalocyanine-modified carbon paste electrode**”, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*,(2002), 373(4-5), 277-83.
65. Siswana, M.; Ozoemena, K. I.; Nyokong, T., “**Electrocatalytic behavior of carbon paste electrode modified with iron (II) phtalocyanine (FePc) nanoparticles towards the detection of amitrole**”, *Talanta*, (2006), 69, 1136-42.
66. Schwarz, J.; Kaden, H., “**Microarrayelectrodes for voltammetric and amperometric detection of organic pollutants**”, *Fresenius Journal Analytical Chemistry*, (2000), 367, 384-7.
67. Alberto Sánchez Arribas, “**Desarrollo y adaptación de un detector electroquímico a equipos comerciales de electroforesis capilar. Análisis de herbicidas con detección simultanea (UV/Amperométrica) en aguas medioambientales**”, Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Madrid, Septiembre de 2003.
68. Schmitt, Ph.; Garrison, A.W.; Freitag, D.; Kettrup, A., “**Separation of s-triazine herbicides and their metabolites by capillary zone electrophoresis, as a function of pH**”, *Journal of Chromatography A*, (1996), 723 (1), 169-77.
69. Catastini, C.; Rafqah, S.; Mailhot, G.; Sarakha, M., “**Degradation of amitrole by excitation of iron (III) aquacomplexes in aqueous solutions**”, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, (2004), 162, 97-103.

70. [www.fao.org/ag/AGP/AGPP/Pesticid/JMPRI/Download/98\\_eva/ amitrole.pdf](http://www.fao.org/ag/AGP/AGPP/Pesticid/JMPRI/Download/98_eva/ amitrole.pdf)
71. Tiselius, A.; *Nova Acta Regiae Soc. Sci. Ups.*; Serv. IV, 7, nº 4, (1930)
72. Virtanen, R., “**Zone electrophoresis in narrow-bore tube employing potentiometric detection. Theoretical and experimental study**” *Acta Polytechnica Scandinavica, Chemistry including Metallurgy Series*, (1974), 123, 67.
73. Everaerts F. M.; Verheggen, Theo P., E., M.; Mikkers, Frans E., P., “**Determination of substances at low concentrations in complex mixtures by isotachopheresis with column coupling**” *Journal of Chromatography*, (1979), 169, 21-38.
74. Jorgenson, J. W.; Lukacs, K. D., “**High-resolution separations based on electrophoresis and electrosmosis**”, *Journal of Chromatography*, (1981), 218, 209-16.
75. Jorgenson, J. E.; Lukacs, K. D., “**Zone electrophoresis in open-tubular glass capillaries**” *Analytical Chemistry*, (1981), 53(8), 1298-302.
76. Tsuda, T.; Nomura, K.; Nakagawa, G., “**Separation of organic and metal ions by high-voltage capillary electrophoresis**”, *Journal of Chromatography*, (1983), 264(3), 385-92.
77. Giddings, J. C., “**Generation of variance, theoretical plates, resolution, and peak capacity in electrophoresis and sedimentation**”, *Separation Science*, (1969), 4(3), 181-9.
78. Terabe, S.; Otsuka, K.; Ichikawa, K.; Tsuchiya, A.; Ando, T., “**Electrokinetic separations with micellar solutions and open-tubular capillaries**”, *Analytical Chemistry*, (1984), 56(1), 111-13.
79. Alberto Fernández Gutiérrez y Antonio Segura Carralero (eds) “**Electroforesis capilar: Aproximación según la técnica de detección**”, Universidad de Granada, Granada 2005, Capítulos 5 y 11.
80. Pacakova, V.; Stulik, K.; Jiskra, J., “**High-performance separations in the determination of triazine herbicides and their residues**”, *Journal of Chromatography A*, (1996), 754(1+2), 17-31.
81. Wieme, R. J., “**Theory of electrophoresis**”, *Chromatography*, 3<sup>rd</sup> Ed. (1975), 228-81.
82. Atamna, I. Z.; Issaq, H. J.; Muschik, G. M.; Janini, G. M., “**Optimization of resolution in capillary zone electrophoresis: combined effect of applied voltage and buffer concentration**” *Journal of Chromatography*, (1991), 588(1-2), 315-20.
83. Ramón Compañó Beltrán y Ángel Ríos Castro, “**Garantía de la calidad en los laboratorios analíticos**”, Editorial Síntesis, Madrid 2002.
84. Rose, D. J.; Jorgenson, J. W., “**Characterization and automation of sample introduction methods for capillary zone electrophoresis**”, *Analytical Chemistry*, (1988), 60(7), 642-8.
85. Terabe, S.; Yashima, T.; Tanaka, N.; Araki, M., “**Separation of oxygen isotopic benzoic acids by capillary zone electrophoresis based on isotope effects on the dissociation of the carboxyl group**”, *Analytical Chemistry*, (1988), 60(17), 1673-7.
86. VanOrman, B. B.; Liversidge, G. G.; McIntire, G. L.; Olefirowicz, T. M.; Ewing, A. G. “**Effects of buffer composition on electrosmotic flow in capillary electrophoresis**”, *Journal of Microcolumn Separations*, (1990), 2(4), 176-80.

87. Yang, Y.; Boysen, R. I.; Hearn, T. W., **“Impact of organic solvents on the resolution of synthetic peptides by capillary electrophoresis”**, *Journal of Chromatography A*, (2004), 1043, 81-9.
88. Miller, J. C. and Miller, J. N., **“Estadística y Quimiometría para Química Analítica”** 4ª ed. Pearson Educación S. A. Madrid 2002, Capítulos 3, 5 y 6.
89. ECC, **“Directive Relating to the Quality of Water Intended for Human Consumption”**, (80/778/ECC; Off. J. Europ. Community), 23 August, L229/1130, 1980.
90. Kappes, T.; Hauser, P. C., **“Electrochemical detection methods in capillary electrophoresis and applications to inorganic species”**, *Journal of Chromatography A*, (1999), 834(1+2), 89-101.
91. Jones, W. R.; Haber, C.; Reineck, J.; McGlynn, M.; Soglia, J., **“Small molecular weight ion analysis using capillary electrophoresis and a commercial open-architecture conductivity detector”**, 3rd Int Symp. CE, Cork, U.K., 1994, poster T12.
92. Haber, C.; Silvestri, I.; Roeoesli, S.; Wilhelm, S., **“Potentiometric detector for capillary zone electrophoresis”**, *Chimia*, (1991), 45(4), 117-21.
93. Kappes, T.; Hauser, P. C., **“Electrochemical detection methods in capillary electrophoresis and applications to inorganic species”**, *Journal of Chromatograph A*, (1999), 834(1+2), 89-101.
94. Valsecchi, S. M.; Polesello, S., **“Analysis of inorganic species in environmental samples by capillary electrophoresis”**, *Journal of Chromatography A*, (1999), 834(1+2), 363-85.
95. Baldwin, R. P., **“Recent advances in electrochemical detection in capillary electrophoresis”**, *Electrophoresis*, (2000), 21(18), 4017-28.
96. Zapardiel, A.; Chicharro, M.; Pérez-López, J. A.; Bermejo, E.; Sánchez, A., **“Detector amperométrico acoplable a equipos de electroforesis capilar comerciales”**, Pat U200101799, Boletín Oficial de la Propiedad Industrial, España, 16/04/2002.
97. Chicharro, M; Sánchez, A., Bermejo, E.; Zapardiel, A.; **“Carbon Nanotubes paste electrodes as new detectors for capillary electrophoresis”**, *Analytical Chimica Acta*, (2005), 543, 84-91.
98. Chicharro, M.; Zapardiel, A.; Bermejo, E.; Sánchez, A.; Gonzalez, R., **“Multiresidue analysis of pesticides in environmental waters by capillary electrophoresis using simultaneous UV and electrochemical detection”**, *Electroanalysis*, (2004), 16(4), 311-8.
99. Beilby, A. L.; Sasaki, T. A.; Stern, H. M., **“Electrochemical pretreatment of Carbon Electrodes as a Function of Potential, pH, and Time”**, *Analytical Chemistry*, (1995), 67(5), 976-80.
100. Ahmed, F. E., **“Analysis of pesticides and their metabolites in foods and drinks”**, *Trends in Analytical Chemistry*, (2001), 20(11), 649-61.
101. Kristenson, E., M.; Brinkman, U. A. Th.; Ramos, L., **“Recent advances in matrix solid-phase dispersion”**, *Trends in Analytical Chemistry*, (2006), 25(2), 96-111.
102. Barker, S. A., **“Matrix solid-phase dispersion”**, *Journal of Chromatography A*, (2000), 885 (1+2), 115-27.

103. Barker, S. A., “**Applications of matrix solid-phase dispersion in food analysis**”, *Journal of Chromatography A*, (2000), 880 (1+2), 63-8.
104. Ramos, L.; Kristenson, E. M.; Brinkman, U. A. Th., “**Current use of pressurized liquid extraction and subcritical water extraction in environmental analysis**”, *Journal of Chromatography A*, (2002), 975(1), 3-29.
105. Lehotay, S. J., “**Supercritical fluid extraction of pesticides in foods**”, *Journal of Chromatography A*, (1997), 785(1+2), 289-312.
106. Sparr, E. C.; Bjorklund, E., “**Analytical-scale microwave-assisted extraction**”, *Journal of Chromatography A*, (2000), 902(1), 227-50.
107. Tadeo, J. L.; Sanchez-Brunete, C., “**Analysis of pesticide residues in fruit juice by matrix-solid phase dispersion and gas chromatographic determination**”, *Chromatographia*, (2003), 57(11/12), 793-8.
108. Kristenson, E. M.; Haverkate, E. G. J.; Slooten, C. J.; Ramos, L.; Vreuls, R. J. J.; Brinkman, U. A. T., “**Miniaturized automated matrix solid-phase dispersion extraction of pesticides in fruit followed by gas chromatographic-mass spectrometric analysis**”, *Journal of Chromatography A*, (2001), 917(1-2), 277-86.
109. Barker, S. A.; Long, A. R., “**Tissue drug residue extraction and monitoring by matrix solid phase dispersion (MSPD)- HPLC analysis**”, *Journal of Liquid Chromatography* (1992), 15(12), 2071-89.
110. Rina, Wu.; Li, J. “**Review on applications of matrix solid-phase dispersion in food safety analysis**”, *Shipin Kexue*, (2005), 26(6), 266-8.
111. Tadeo, J. L.; Sánchez-Brunete, C.; Pérez, R. A., “**Herbicide residues**”, *Food Science and Technology* (2004), 138(Handbook of Food Analysis, volume 2), 1269-95.
112. Grujic, S.; Radisic, M.; Vasiljevic, T.; Lausevic, M., “**Determination of carbendazim residues in fruit juices by liquid chromatography-tandem mass spectrometry**”, *Food Additives & Contaminants*, (2005), 22(11), 1132-7.
113. Barker, S. A., “**Use of matrix solid-phase dispersion for determining pesticides in fish and foods**”, *Methods in Biotechnology*, (2006), 19(Pesticide Protocols), 285-96.
114. Lopes, W. G.; Dorea, H. S., “**Determination of pesticides in beans by matrix solid-phase dispersion (MSPD)**”, *Pesticidas*, (2003), 13, 73-82.
115. Navarro, M.; Pico, Y.; Marin, R.; Manes, J., “**Application of matrix solid-phase dispersion to the determination of a new generation of fungicides in fruits and vegetables**”, *Journal of Chromatography A*, (2002), 986(1-2), 201-9.
116. Valenzuela, A.; Lorenzini, R.; Redondo, M. J.; Font, G., “**Matrix solid-phase dispersion microextraction and determination by high-performance liquid chromatography with UV detection of pesticide residues in citrus fruit**”, *Journal of Chromatography A*, (1999), 839(1+2), 101-7.
117. Chicharro, M.; Moreno, M.; Bermejo, E.; Ongay, S.; Zapardiel, A., “**Determination of amitrole and urazole in water samples by capillary zone electrophoresis using simultaneous UV and amperometrical detection**”, *Journal of Chromatography A*, (2005), 1099, 191-197.

118. Trojanowicz, M.; Mulchandani, A.; Mascini, M., “**Carbon nanotubes-modified screen-printed electrodes for chemical sensors and biosensors**”, *Analytical Letters*, (2004), 37(15), 3185-204.
119. Bard, Allen, J.; Faulkner, Larry, R., “**Electrochemical methods. Fundamentals and Applications**”, John Wiley & Sons, INC., second edition. USA 2001, Capítulos: 1, 5, 6, 9, 12, 14
120. Adams, R. N., “**Electrochemistry at solid electrodes**”, Marcel Dekker, New York 1969, Capítulo: 8
121. Pingarron, J. M. y Sánchez, P.; “**Química electroanalítica. Fundamentos y aplicaciones**” Ed. Síntesis, Madrid 1999, Capítulo:12 y 19.
122. Ernst, H.; Knoll, M., “**Electrochemical characterization of uric acid and ascorbic acid at a platinum electrode**”, *Analytical Chimica Acta*, (2001), 449(1-2), 129-34.
123. Fotouhi, L.; Hajilari, F.; Heravi, M. M., “**Electrochemical behavior of some thiotriazoles in aqueous-alcoholic media at GCE**”, *Electroanalysis*, (2002), 14(24), 1728-32.
124. Nicholson, R. S.; Shain, I., “**Theory of stationary electrode polarography**”, *Analytical Chemistry*, (1964), 36, 706-23.
125. Kolthoff, J. M.; Lingane, J. J., “**Polarography**”, Interscience (1965), vol 1, pág 73.
126. Meites, L., “**Polarographic Techniques**”, John Wiley, 1965.
127. Zare, H. R.; Memarzadeh, F.; Ardakani, M. M.; Namazian, M.; Golabi, S. M., “**Norepinephrine modified glassy carbon electrode for the simultaneous determination of ascorbic acid and uric acid**”, *Electrochimica Acta*, (2005), 50, 3495-502.
128. Bermejo, E.; Zapardiel, A.; Perez-Lopez, J. A.; Chicharro, M.; Sánchez, A.; Hernandez, L., “**Electrochemical study of mefexamide at glassy-carbon electrodes and its determination in urine by differential pulse voltammetry**”, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, (2000), 481(1), 52-61.
129. Da Pozzo, A.; Merli, C.; Sires, I.; Garrido, J. A.; Rodríguez, R. M.; Brillas, E., “**Removal of the herbicide amitrole from water by anodic oxidation and electron-Fenton**”, *Environmental Chemistry Letters*, (2005), 3(1), 7-11.
130. Watanabe, N.; Horikoshi, S.; Kawasaki, A.; Hidaka, H., “**Formation of refractory ring-expanded triazine intermediates during the photocatalyzed mineralization of the endocrine disruptor amitrole and related triazole derivatives at UV-irradiated TiO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O interfaces**”, *Environmental Science & Technology*, (2005), 39(7), 2320-26.
131. Zygmunt Marczenko, “**Spectrophotometric determination of elements**”, ELLIS HORWOOD LIMITED, New York, 1976, pág: 394-5.
132. F. Burriel Martí, F. Lucena Conde, S. Arribas Jimeno, J. Hernández Méndez. “**Química analítica cualitativa**”, Paraninfo, Madrid 1999, pág: 844-5
133. Lund, H., “**Organic Electrochemistry**”, Marcel Dekker, New York 1991, pp. 585-9
134. Stassen, I.; Hambitzer, G., “**Anodic oxidation of aniline and N-alkyl anilines in aqueous sulphuric acid and studies by electrochemical thermospray mass spectrometry**”, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, (1997), 440, 219-28.

135. J. Ibañez, "**Environmental Electrochemistry**", Ed K. Rajeshwar, Academic Press, California 1997, capítulo 5.
136. Dunsch, L., "**Kinetik and mechanismus der anodischen anilin-oxidation**", *Journal of Electroanalytical Chemistry*, (1975), 61, 61-80.
137. Castelfranco, P.; Oppenheim, A.; Yamaguchi, S., "**Riboflavine-mediated photodecomposition of amitrol in relation to chlorosis**", *Weeds*, (1963), 11(2), 111-5
138. Kertit, S.; Aride, J.; Srhiri, A.; Ben-Bachir, A.; El-Kacemi, K.; Etman, M., "**Electropolymerisation de monomere 3-amino-1,2,4-triazole sur une electrode de cuivre et effet du polymere sur la corrosion de l'electrode en milieu NaCl 3%**", *Journal of Applied Electrochemistry*, (1993), 23, 835-40.
139. James, S. Fritz, "**Analytical solid-phase extraction**", Wiley. Vch., New York 1999.
140. Pocurull, E.; Calull, M.; Marce, R. M.; Borrull, F. "**Comparative study of solid-phase extraction of phenolic compounds. Influence of the ion pair reagent**", *Chromatographia*, (1994), 38(9-10), 579-84.
141. Crescenzi, C.; Di Corcia, A.; Passariello, G.; Samperi, R.; Turnes, C. M., "**Evaluation of two new examples of graphitized carbon blacks for use in solid-phase extraction cartridges**", *Journal of Chromatography A*, (1996), 733(1+2), 41-55.
142. Castillo, M.; Puig, D.; Barcelo, D., "**Determination of priority phenolic compounds in water and industrial effluents by polymeric liquid-solid extraction cartridges using automated sample preparation with extraction columns and liquid chromatography. Use of liquid-solid extraction cartridges for stabilization of phenols**", *Journal of Chromatography A*, (1997), 778 (1+2), 301-11.
143. Masque, N.; Marce, R. M.; Borrull, F., Comack, P. A.; Sherrington, D. C., "**Synthesis and evaluation of a molecularly imprinted polymer for selective on-line solid-phase extraction of 4-nitrofenol from environmental water**", *Analytical Chemistry*, (2000), 72(17), 4122-6.
144. Haginaka, J., "**Selectivity of affinity media in solid-phase extraction of analytes**", *Trends in Analytical Chemistry*, (2005), 24(5), 407-15.
145. Fontanals, N.; Marce, R. M.; Borrull, F., "**New hydrophilic materials for solid-phase extraction**", *Trends in Analytical Chemistry*, (2005), 24(5), 394-405.
146. Soriano, J. M.; Jiménez, B.; Font, G.; Moltó, J. C., "**Analysis of Carbamate Pesticides and their Metabolites in Water by Solid Phase Extraction and Liquid Chromatography: A review**", *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, (2001), 31(1): 19-52.
147. Marce, R. M.; Borrull, F., "**Solid-phase extraction of polycyclic aromatic compounds**", *Journal of Chromatography A*, (2000), 885, 273-90.
148. Carson, M. C., "**Ion-pair solid-phase extraction**", *Journal of Chromatography A*, (2000), 885, 343-50.
149. Gimeno, R. A.; Beltran, J. L.; Marce, R. M.; Borrull, F., "**Determination of naphthalenesulfonates in water by on-line ion-pair solid-phase extraction and ion-pair liquid chromatography with fast-scanning fluorescence detection**", *Journal of Chromatography A*, (2000), 890(2), 289-94.

150. Gimeno, R. A.; Marce, R. M.; Borrull, F., "**Determination of aromatic sulfonates in coastal water by on-line ion-pair solid-phase extraction/ion-pair liquid chromatography with UV detection**", *Chromatographia*, (2001), 53(1/2), 22-6.
151. AbuRuz, S.; Millership, J.; McElnay, J., "**Determination of metformin in plasma using a new ion pair solid phase extraction technique and ion pair liquid chromatography**", *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, (2003), 798(2), 203-9.
152. Hu, Y.-Y.; He, Y.-Z.; Quia, Li-Li; Wang, L., "**On-line ion pair solid-phase extraction of electrokinetic multicommutation for determination of trace anion surfactants in pond water**", *Analytica Chimica Acta*, (2005), 536(1-2), 251-7.
153. Castro, R.; Moyano, E.; Galceran, M.T., "**On-line ion-pair solid-phase extraction-liquid chromatography-mass spectrometry for the analysis of quaternary ammonium herbicides**", *Journal of Chromatography, A* (2000), 869(1+2), 441-9.
154. Tiziana, C. M.; Strongoli, M. C.; Nistico, G., "**Determination of paraquat in rat brain using ion-pair solid-phase extraction and reversed-phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection**", *Journal of Chromatography*, (1990), 527(1), 189-95.
155. Wang, R.H.; Su, S.-M.; Qin, G.-M., "**Ion-pair solid-phase extraction (SPE) and HPLC analysis of paraquat in biological simple**", *Fa yi xue za zhi*, (2005), 21(2), 121-3.
156. Corasaniti, M. T.; Nistico, G., "**Determination of paraquat in rat brain by high-performance liquid chromatography**", *Journal of Chromatography*, (1993), 643(1-2), 419-25.
157. Rusling, J. F., "**Controlling electrochemical catalysis with surfactant microstructures**", *Accounts of Chemical Research*, (1991), 24(3), 75-81.
158. Plavsic, M.; Krzmanic, D.; Cosovic, B., "**The electrochemical processes of copper in the presence of Triton X-100**", *Electroanalysis*, (1994), 6(5-6), 469-74.
159. Wang, L.-H.; Tseng, S.-W., "**Direct determination of d-panthenol and salt of pantothenic acid in cosmetic and pharmaceutical preparations by differential pulse voltammetry**", *Analytica Chimica Acta*, (2001), 432, 39-48.
160. Chattopakhayay, K.; Mazumdar, S., "**Direct electrochemistry of heme proteins: effect of electrode surface modification by neutral surfactants**", *Bioelectrochemistry*, (2001), 53(1), 17-24.
161. Rajendra, N. G.; Neena, J.; Priyanka, G., "**Electrochemical studies of 1,3,7,9-tetramethyluric acid in aqueous and micellar media**", *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, (1999), 162, 239-47.
162. Castillo, M.; Almeida, L. E.; Tabak, M.; Mazo, L. H., "**The electrochemical oxidation of the antioxidant drug dipyrindamole at glassy carbon and graphite electrodes in micellar solutions**", *Electrochimica Acta*, (2000), 46, 67-75.
163. Wen, X.-L.; Jia, Y.-H.; Liu, Z.-L., "**Micellar effects on the electrochemistry of dopamine and its selective detection in the presence of ascorbic acid**", *Talanta*, (1999), 50, 1027-33.



164. Xie, P.; Chem, X.; Wang, F.; Hu, Ch., Hu, S., **“Electrochemical behaviors of adrenaline at acetylene black electrode in the presence of sodium dodecyl sulphate”**, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, (2006), 48, 17-23.
165. Iijima, S., **“Helical microtubules of graphitic carbon”**, *Nature*, (1991), 354(6348), 56-8.
166. Ajayan, P. M., **“Nanotubes from Carbon”**, *Chemical Reviews*, (1999), 99(7), 1787-99.
167. Trojanowics, M., **“Analytical applications of carbon nanotubes: a review”**, *Trends in Analytical Chemistry*, (2006), 25(5), 480-9.
168. Britto, P. J.; Santhanam, K. S. V.; Ajayan, P. M., **“Carbon nanotube electrode for oxidation of dopamine”**, *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, (1996), 41, 121-5.
169. Banks, G. E.; Compton, R. G., **“New electrodes for old: from carbon nanotubes to edge plane pyrolytic graphite”**, *Analyst*, (2006), 131, 15-21.
170. Wang, J.; Li, M.; Shi, Z.; Li, N.; Gu, Z., **“Direct electrochemistry of cytochrome C at a glassy carbon electrode modified with single-wall carbon nanotubes”**, *Analytical Chemistry*, (2002), 74, 1993-7.
171. Wu, F.-H.; Zhao, G.-C.; Wei, X.-W., **“Electrocatalytic oxidation of nitric oxide at multi-walled carbon nanotubes modified electrode”**, *Electrochemistry Communications*, (2002), 4(9), 690-4.
172. Liu, G.; Lin, Y.; Tu, Y.; Ren, Z., **“Ultrasensitive voltammetric detection of trace heavy metal ions using carbon nanotube nanoelectrode array”**, *Analyst*, (2005), 130(7), 1098-101.
173. Xu, Z.; Chen, X.; Qu, X.; Dong, S., **“Electrocatalytic oxidation of catechol at multi-walled carbon nanotubes modified electrode”**, *Electroanalysis*, (2004), 16(8), 684-7.
174. Ye, J.-S.; Wen, Y.; De Zhang, W.; Gan, L. M.; Xu, G. Q.; Sheu, F.-S., **“Selective voltammetric detection of uric acid in the presence of ascorbic acid at well-aligned carbon nanotube”**, *Electroanalysis*, (2003), 15(21), 1693-8.
175. Wang, J.; Hocevar, S. B.; Ogorevc, B., **“Carbon nanotube-modified glassy carbon electrode for adsorptive stripping voltammetric detection of ultratrace levels of 2,4,6-trinitrotolueno”**, *Electrochemistry Communications*, (2004), 6(2), 176-9.
176. Musameh, M.; Wang, J.; Merkoci, A.; Lin, Y., **“Low-potential stable NADH detection at carbon-nanotube-modified glassy carbon electrode”**, *Electrochemistry Communications*, (2002), 4(10), 743-6.
177. Wang, J., **“Carbon-nanotube based electrochemical biosensors: a review”**, *Electroanalysis*, (2005), 17(1), 7-14.
178. Hun, C. G.; Wang, W. L.; Wang, S. X.; Zhu, W.; Li, Y., **“Investigation on electrochemical properties of carbon nanotubes”**, *Diamond and Related Materials.*, (2003), 1295-9.
179. Wang, S.-F.; Xu, Q., **“Square wave voltammetry determination of brucine at multiwall carbon nanotube-modified glassy carbon electrodes”**, *Analytical Letters*, (2005), 38(4), 657-71.
180. Rubianes, M. D.; Rivas, G. A., **“Dispersion of multi-wall carbon nanotubes in polyethylenimine: A new alternative for preparing electrochemical sensors”**, *Electrochemistry communications*, (2006), doi: 10.1016/j.e.com.2006.08.057.

181. Zhao, Y.; Gao, Y.; Zhan, D.; Liu, H.; Zhao, Q.; Kou, Y.; Shao, Y.; Li, M.; Zhuang, Q.; Zhu, Z., **“Selective detection of dopamine in the presence of ascorbic acid and uric acid by a carbon nanotubes-ionic liquid gel modified electrode”**, *Talanta*, (2005), 66(1), 51-7.
182. Guo, M.; Chen, J.; Li, J.; Tao, B.; Yao, S., **“Fabrication of polyaniline/carbon nanotube composite modified electrode and its electrocatalytic property to the reduction of nitrite”**, *Analytica Chimica Acta*, (2005), 532(1), 71-7.
183. Wildgoose, G. G.; Leventis H. C.; Streeter Ian; Lawrence N. S.; Wilkins S. J.; Jiang, L.; Jones, T. G.; Compton, R. G., **“Abrasively immobilised multiwalled carbon nanotube agglomerates: a novel electrode material approach for the analytical sensing of pH”**, *Chemphyschem: a European Journal of Chemical Physics and Physical Chemistry*, (2004), 5(5), 669-77.
184. Cheng, F.-L.; Du, S.; Jin, B.-K., **“Electrochemical studies of cytochrome c on electrodes modified by single-wall carbon nanotubes”**, *Chinese Journal of Chemistry*, (2003), 21(4), 436-41.
185. Valentini, F.; Amine, A.; Orlanducci, S.; Terranova, M. L.; Palleschi, G., **“Carbon Nanotube Purification: Preparation and Characterization of Carbon Nanotube Paste Electrodes”**, *Analytical Chemistry*, (2003), 75(20), 5413-21.
186. Rubianes, M. D.; Rivas, G. A., **“Carbon nanotubes paste electrode”**, *Electrochemistry Communications*, (2003), 5(8), 689-94.
187. Pedano, M. L.; Rivas, G. A., **“Adsorption and electrooxidation of nucleic acids at carbon nanotubes paste electrodes”**, *Electrochemistry Communications*, (2004), 6(1), 10-6.
188. Cai, Y.; Jiang, G.; Liu, J.; Zhou, Q., **“Multiwalled carbon nanotubes as a solid-phase extraction adsorbent for the determination of bisphenol A, 4-n-nonyphenol, and 4-tert-octylphenol”**, *Analytical Chemistry*, (2003), 75(10), 2517-21.
189. Huang, W.; Hu, W.; Song, J., **“Adsorptive stripping voltammetric determination of 4-aminophenol at a single-wall carbon nanotubes film coated electrode”**, *Talanta*, (2003), 61(3), 411-6.
190. Dai, H., **“Carbon nanotubes: opportunities and challenges”**, *Surface Science*, (2002), 500(1-3), 218-41.
191. Wang, S. G.; Zhang, Q.; Wang, R.; Yoo, S. F. **“A novel multi-walled carbon nanotube-based biosensor for glucose detection”**, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, (2003), 311(3), 572-6.
192. Davis, J. J.; Coles, R. J.; Hill, H. A. O., **“Protein electrochemistry at carbon nanotubes electrodes”**, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, (1997), 440(1-2), 279-82.
193. Wang, Z.; Liu, J.; Liang, Q.; Wang, Y.; Luo, G., **“Carbon nanotube-modified electrodes for the simultaneous determination of dopamine and ascorbic acid”**, *Analyst*, (2002), 127(5), 653-8.
194. Bowers, M. L.; Yenser, B. A., **“Electrochemical behavior of glassy carbon electrodes modified by electrochemical oxidation”**, *Analytical Chimica Acta*, (1991), 243(1), 43-53.
195. Cabaniss, G. E.; Diamantis, A. A.; Murphy, W. R.; Linton, T. W.; Meyer, T. J., **“Electrocatalysis of proton-coupled electron-transfer reactions at glassy carbon electrodes”**, *Journal of the American Chemical Society*, (1985), 107(7), 1845-53.

196. Nagaoka, T.; Yoshino, T., “**Surface properties of electrochemically pretreated glassy carbon**”, *Analytical Chemistry* (1986), 58(6), 1037-42.
197. Zhao, G.; Zang, S.; Liu, K.; Lin, S.; Liang, J.; Guo, X.; Zhang, Z., “**Determination of trace xanthine by anodic stripping voltammetry with carbon nanotube modified glassy carbon electrode**”, *Analytical Letters*, (2002), 35(14), 2233-44.
198. Zhao, G.; Liu, K.; Lin, Song; Liang, Ji; Guo, X; Zhang, Z., “**Application of a carbon nanotube modified electrode in anodic stripping voltammetry for determination of trace amounts of 6-benzylaminopurine**”, *Microchimica Acta*, (2003), 143(4), 255-60.
199. Yang, C., “**Electrochemical determination of 4-Nitrophenol using a single-wall carbon nanotube film-coated glassy carbon electrode**”, *Microchimica Acta*, (2004), 148(1-2), 87-92.
200. Zeng, B. Z.; Huang, F., “**Electrochemical behavior and determination of fluphenazine at multi-walled carbon nanotubes/(3-mercaptopropyl)trimethoxysilane bilayer modified gold electrodes**”, *Talanta*, (2004), 64(2), 380-6.



## **8. PUBLICACIONES DERIVADAS**



