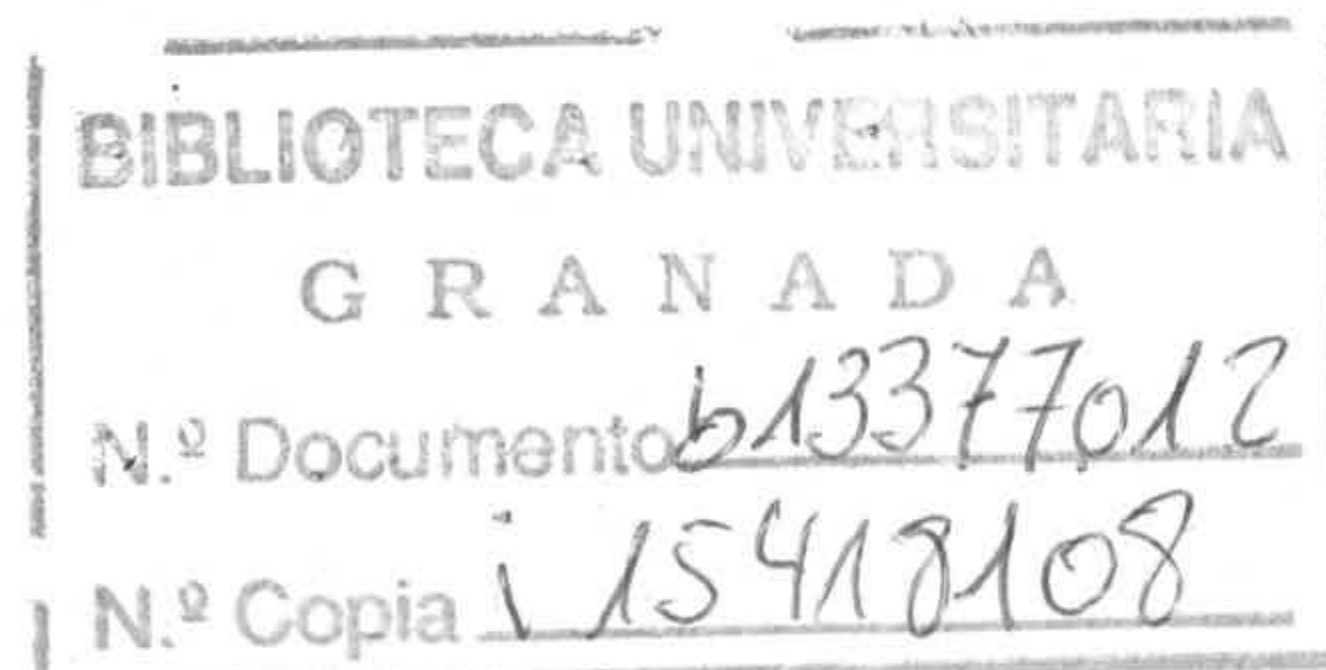


UNIVERSIDAD DE GRANADA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

**APLICACIÓN DE LA FOSFORESCENCIA EN FASE SÓLIDA A
TEMPERATURA AMBIENTE EN EL ANÁLISIS DE PLAGUICIDAS**

TESIS DOCTORAL

MAHMOUD KHALIL DEHEIDEL
GRANADA, 2000



**APLICACIÓN DE LA FOSFORESCENCIA EN FASE SÓLIDA A
TEMPERATURA AMBIENTE EN EL ANÁLISIS DE PLAGUICIDAS**

Por

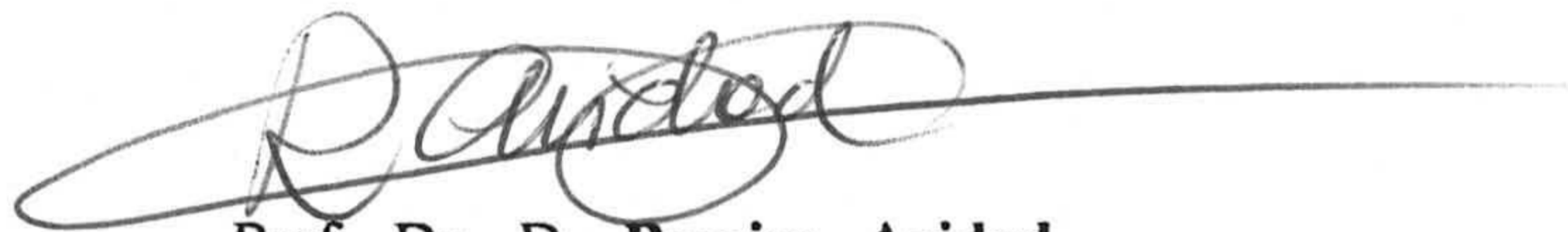
MAHMOUD KHALIL DEHEIDEL

**Departamento de Química Analítica
Universidad de Granada**

VISADO en Granada, a 24 de
Abril de 2000



Fdo.-
Prof. Dr. D. **Luis Fermín
Capitán Vallvey**, Catedrático del
Departamento de Química
Analítica de la Universidad de
Granada



Prof. Dr. D. **Ramiro Avidad
Castañeda**, Profesor Titular del
mismo Departamento

MEMORIA presentada para
aspirar al Grado de Doctor en
Ciencias Sección Químicas.
Granada, a 24 de Abril
de 2000



Fdo.-**Mahmoud K.A. Deheid**
Licenciado en Ciencias, sección
de Químicas.

**A MI ESPOSA
A MIS HIJOS**

Permítanme, en primer lugar, mostrar aquí mi agradecimiento a los Directores de ésta Memoria, Dr. D. Luis Fermin Capitán Vallvey, y Dr. D. Ramiro Avidad Castañeda, por la generosidad y estimable dedicación que de ellos he recibido, por toda la ayuda y por los consejos que tan sabiamente siempre me han dado.

Al Departamento de Química Analítica de la Universidad de Granada, por su magnífica acogida y hospitalidad.

A la Universidad de Hebron, por dejarme el tiempo suficiente para terminar mis estudios de Doctorado y por el gran apoyo que me ha dado.

A la Agencia Española de Cooperación Internacional (AECI), Programa de Colaboración con el Mundo Árabe, del Ministerio de Asuntos Exteriores de España, por la concesión de una Beca de investigación durante cuatro años.

A mi Esposa Dalal por estar siempre pendiente de mí, espero que algún día sus sueños de ser Doctora famosa en Estudios Semíticos (Lengua Árabe) se hagan realidad.

A mis hijos Layth, Furat y Shatha, las flores de mi vida, por la alegría y tranquilidad que me han dado.

Con especial mención al Dr. D. Alberto Navalón por su constante apoyo.

A todos mis compañeros y amigos del Departamento y de fuera, con ellos compartí muchos de mis malos y también buenos momentos.

INTRODUCCIÓN	
RESUMEN HISTÓRICO	4
CLASIFICACIÓN DE LOS PESTICIDAS	6
USO Y MODO DE ACTUAR DE LOS PESTICIDAS	15
VENTAJAS E INCONVENIENTES DEL USO DE PESTICIDAS	18
TOXICIDAD DE LOS PESTICIDAS	22
DEGRADACIÓN DE LOS PESTICIDAS	28
ANÁLISIS DE PESTICIDAS	30
Cromatografía de gases	33
Cromatografía líquida de alta resolución	34
Cromatografía en capa fina	35
Técnicas luminiscentes	36
ESPECTROFOSFORIMETRÍA	43
Procesos fotoluminiscentes	44
Emisión de fosforescencia	48
Factores que afectan a la emisión fosforescente	52
Factores que dependen de la muestra	59
Fosforescencia a temperatura ambiente	63
Sensores de fosforescencia	70
OBJETIVOS	77
BIBLIOGRAFÍA	79

INTRODUCCIÓN

La palabra pesticida, sinónima de plaguicida, etimológicamente deriva de la raíz *pest*, que alude a las pestes o plagas que sufre la agricultura, y del sufijo *cida* derivado del verbo latino *caedere* que significa matar. De ahí que podamos decir que pesticida es toda sustancia química usada para controlar plagas de insectos, roedores, hongos o cualquier otra especie biológica que pueda suponer un peligro para la especie humana cuando se desarrollan excesivamente. Aunque las palabras pesticida y plaguicida son las de uso más frecuente, sin embargo, el nombre oficial de estos productos es el de productos agrofarmacéuticos ó productos fitosanitarios que, en términos jurídicos, reciben el nombre de productos antiparasitarios de uso agrícola.

Según la Organización Mundial para la Salud el término pesticida debe emplearse para designar cualquier sustancia, o mezcla de sustancias, destinada a prevenir o controlar cualquier especie de plantas o animales indeseables, incluyendo también cualquier otra sustancia, o mezcla de ellas, que produzca efectos defoliantes ó desecantes ó esté destinada a controlar el crecimiento de las plantas. Sin embargo, en una nota aclaratoria a la definición anterior, el citado organismo añade que también deberán incluirse como pesticidas aquellas sustancias que puedan ser usadas para controlar plagas durante la producción, transporte, almacenamiento o procesado de alimentos para uso del hombre o de los animales, así como cualquier sustancia que se pueda administrar al hombre o los animales para eliminar insectos o arácnidos de su cuerpo.

Sin embargo, el término pesticida no debe aplicarse a aquellos productos químicos dedicados al control de enfermedades infecciosas, como es el caso de los antibióticos, ni tampoco a aquellos otros productos cuya misión es la de estimular el crecimiento o modificar conductas sociales de los animales como son los fertilizantes o los modificadores de conductas sexuales en los animales.

Como podemos deducir de las definiciones y la terminología empleada para su designación, entre los pesticidas podemos incluir una serie de sustancias químicas cuyo uso no es exclusivamente agrícola ya que podemos considerar como tales aquellos compuestos químicos de uso doméstico destinados al exterminio de insectos, arácnidos o roedores de hábitos domésticos, que pueden ser un peligro, o una molestia, para el hombre, las plantas ornamentales o los animales domésticos que con él conviven. Ahora bien, aunque este sea un capítulo cada vez más importante para la industria química, que ha de conseguir sustancias de gran efectividad y poca o nula toxicidad para el hombre, el verdadero reto de la industria química de producción de pesticida se encuentra en su aplicación agrícola, puesto que la producción de pesticidas eficaces para el control de plagas, de baja toxicidad para el hombre y los animales y de fácil y apropiada degradación para que no afecte al medio ambiente, es la meta a conseguir.

Resumen histórico. Es una evidencia que desde el momento en que el hombre pasó de ser simplemente recolector a cultivador de la tierra, hasta nuestros días cada vez ha sido mayor la necesidad de disponer de terreno cultivable, lo cual supone una alteración inevitable del equilibrio natural. Grandes extensiones de terreno son dedicadas al cultivo extensivo de determinadas especies vegetales que garantizan nuestra subsistencia, pero también es cierto que estos monocultivos, que suponen un desequilibrio en el orden natural, favorecen la aparición y desarrollo de sus depredadores naturales que, si no son controlados artificialmente, pueden exterminar el cultivo. Es por ello que, desde muy antiguo, el hombre ha intentado controlar la proliferación de estas plagas. Desde el año 1550 antes de Cristo existen papiros egipcios en los que se dan fórmulas para expulsar pulgas de los hogares. Homero en su *Odisea* señala como Ulises quema azufre para purificar

la entrada, la casa y el patio de su vivienda y Plinio el Viejo nos describe el uso de arsénico como insecticida. Posteriormente, hacia el año 900 de nuestra era, se sabe que los chinos utilizaban este elemento, el arsénico, para controlar las plagas de insectos en los jardines, pero el primer documento conocido del mundo occidental en el que se describe el uso de arsénico en forma de arseniato como insecticida, data de 1669. Según este documento, el arseniato mezclado con miel de abeja se utilizaba para combatir las plagas de hormigas domésticas. De la misma fecha es el documento en el cual se describe el uso del tabaco como insecticida de contacto. Sin embargo, el primer intento consciente de lucha química contra las plagas del campo al parecer corresponde a los arboricultores de Montreuil que en 1763 comenzaron a utilizar el jugo del tabaco para combatir el pulgón de los melocotoneros.

Durante el siglo XVIII y parte del XIX son pocas las referencias que nos quedan de la lucha química contra las plagas, siendo a partir de mediados del siglo XIX cuando la lucha química contra los insectos y plagas en general comienza a desarrollarse de forma más o menos sistemática. Fue entonces cuando comenzaron a utilizarse productos químicos orgánicos tales como la rotenona extraída de la raíz del *derris*, o el piretro que es una mezcla de ésteres obtenidos a partir de las flores del crisantemo, ó de productos inorgánicos como el *caldo bordelés* (disolución de sulfato de cobre) que se utiliza desde finales del siglo XIX contra el *mildium* de la vid. No obstante, aunque durante la primera mitad del presente siglo el uso de las citadas sustancias fue extendiéndose en la agricultura, el verdadero despegue de la lucha química contra las plagas, podemos decir que comienza con el fin de la segunda guerra mundial. Es entonces cuando se producen tres cambios importantes: primero, se utilizan productos químicos de síntesis; segundo, se obtienen numerosos productos con diferentes fines (insecticidas, fungicidas, herbici-

das,...) y tercero, todos estos productos se utilizan masivamente para combatir las plagas del campo.

Esta introducción de nuevos pesticidas en el mercado no ha sido simultánea para los distintos productos, de manera que mientras que los insecticidas y fungicidas se utilizan desde mediados del pasado siglo, los herbicidas comenzaron a utilizarse hacia 1925. Por otra parte, el número de compuestos de síntesis que se han introducido en el mercado en las últimas décadas tampoco ha sufrido un crecimiento homogéneo, así, en la actualidad nos encontramos que la mayoría de los pesticidas disponibles en el mercado son insecticidas, en segundo lugar se encuentran los herbicidas y finalmente los fungicidas. Esto no siempre ha sido así ya que hasta el año 1960 el número de herbicidas disponibles para usos agrícolas era inferior al de fungicidas, sin embargo, a partir de 1960 el crecimiento de los herbicidas fue espectacular mientras que el número de fungicidas creció a un ritmo más lento.

En la actualidad la investigación acerca de la síntesis de nuevos pesticidas, parece estar centrada en la consecución de productos que, aunque sean más tóxicos que los ya conocidos, presenten la ventaja de ser rápidamente degradables dando productos no tóxicos que no se acumulen en las cadenas alimentarias ni contaminen el medio ambiente.

Clasificación de los pesticidas. Los productos químicos, sintéticos o naturales, que se usan como pesticidas en la actualidad podemos clasificarlos de acuerdo con diferentes criterios. El criterio más frecuente, sobre todo desde el punto vista químico, es el de su composición química, pero no hemos de olvidar que también pueden clasificarse de acuerdo con su utilidad, su forma de aplicación o con cualquier otro criterio de carácter técnico, químico, agrícola o comercial. Nosotros los

vamos a clasificar de acuerdo con dos criterios: la utilidad para la que son destinados y la composición química que presentan.

Desde el punto de vista de la utilidad a la que son destinados, los pesticidas se pueden clasificar en los siguientes grupos:

- *Insecticidas*, entendiéndose como tales aquellas sustancias que se utilizan específicamente para controlar las plagas de insectos tales como pulgones, cochinillas, taladradores, chupadores de savia, etc.
- *Acaricidas*, que serán aquellos plaguicidas utilizados para el control de los ácaros que pueden atacar tanto a los animales como a las plantas: araña roja y ácaros en general.
- *Nematicidas*, que serán aquellos productos químicos utilizados como controladores de las plagas de nemátodos y gusanos.
- *Moluscocidas*, o pesticidas utilizados específicamente a combatir las plagas de moluscos, tales como caracoles y babosas.
- *Rodenticidas*, o pesticidas específicos para el control de roedores, tales como topos, ratas y ratones.
- *Fungicidas*, también conocidos como *anticriptogámicos*, que son los compuestos químicos dedicados a combatir la proliferación de hongos parásitos causantes de multitud de enfermedades en las cosechas agrícolas durante su cultivo en el campo (mildium, oidium, royas, etc.) o bien, determinantes de la marchitez y podredumbre de las mismas durante su almacenamiento, como es el caso de la podredumbre y el moteado que sufre la fruta una vez recolectada.
- *Herbicidas*. Es este tipo de pesticidas el que mayor desarrollo ha alcanzado en los últimos años gracias a que su acción simplifica la mano de obra al impedir el crecimiento de hierbas adventicias no deseadas.

- *Esfoliantes o defoliantes*, que son sustancias que producen la caída de la hoja de determinadas plantas impidiendo su proliferación.
- *Desecantes*, que son sustancias de utilidad similar a la de los anteriores pero cuya acción es más drástica debido a que desecan las plantas.
- *Esterilizantes*, dedicados a producir la esterilidad de insectos.
- *Bacterias patógenas*, cuya misión es la de provocar epidemias entre los insectos que atacan a los cultivos.
- *Desinfectantes*. Son aquellas sustancias utilizadas para eliminar cualquier tipo de insecto, hongo, nematodo, molusco o mala hierba que se encuentre en el suelo antes de proceder a la siembra de la cosecha. Su acción es general y drástica.
- *Reguladores del crecimiento*. Sustancias que actúan fisiológicamente impidiendo el crecimiento de aquellas plantas que pueden ser perjudiciales para el cultivo.
- *Atrayentes o repelentes*. Sustancias que atraen a los insectos hacia un cebo o recipiente del que no pueda salir, o bien repelen al insecto evitando su acción sobre el cultivo o el animal.

Esta clasificación, que no es exhaustiva, contiene los principales grupos de pesticidas ordenados de acuerdo con la función específica para la cual son empleados. Ahora bien, si consideramos los tipos de plagas para los que ejercen su acción independientemente de la forma en la que la realizan, la anterior clasificación se puede reducir sensiblemente a cuatro tipos de pesticidas, *insecticidas* que serán aquellos pesticidas que evitan, de la forma que sea, la acción de los insectos y similares; *herbicidas* o sustancias dedicadas a evitar la acción de las plantas no deseadas en los cultivos; *fungicidas* que evitarán la acción de los hongos y *rodenticidas*, o sustancias que impiden la acción de los roedores.

Desde el punto de vista de la composición química del producto, independientemente de su utilidad y aplicación, los pesticidas anteriormente reseñados se pueden clasificar en dos grandes grupos, en el primero de ellos incluiremos los productos de carácter inorgánico y en el segundo los de carácter orgánico. De acuerdo con este criterio y sin ánimo de ser exhaustivos, podemos establecer la siguiente clasificación.

En el grupo de los fungicidas:

- *Productos inorgánicos.* Existe un cierto número de elementos químicos y compuestos inorgánicos derivados de ellos que son utilizados desde antiguo, bien individualmente o bien mezclados entre sí, por su capacidad para evitar la acción de los hongos que afectan a los cultivos o a los alimentos una vez almacenados. Los más conocidos son: azufre, polisulfuros, mezcla de azufre y $\text{Ca}(\text{OH})_2$, sales de cobre (CuSO_4 , CuCO_3 o CuCrO_4), ZnCrO_4 y NaAsO_2 .

El azufre y los polisulfuros se vienen utilizando desde hace más de un siglo como fungicidas de acción eficaz contra enfermedades del tipo de *oidium* tanto en viñedos como en frutales y hortalizas. Los derivados del cobre se emplean con éxito en el tratamiento otoñal de las semillas y, en el caso del cromato, se utiliza para el tratamiento de ciertas enfermedades del césped.

- *Productos orgánicos.* Los productos orgánicos utilizados específicamente como fungicidas los podemos clasificar en los siguientes grupos químicos:
 - *Fenoles.* Varios derivados clorados del fenol se pueden utilizar como fungicidas. De todos ellos vamos a resaltar los siguientes: 2,4,5-triclorofenol; diclorofeno y hexaclorofeno; este último tristemente célebre en Francia (1972) por los trastornos debidos al talco Morhange.
 - *Quinonas.* Como el cloranil o tetracloro-p-benzoquinona.
 - *Crotonanilidas.* Como el benodanil que es un derivado iodado.

- *Tioftalamidas*. Como el captan que es un fungicida bacteriostático.
- *Ditiocarbamatos*. Como el maneb que contiene manganeso complejado en su molécula y presenta una fuerte acción fungicida.
- *Heterociclos nitrogenados*. Grupo este al que pertenecen la mayoría de los fungicidas utilizados en agricultura entre los que se encuentran: tia-bendazol, benomilo, hymexazol, y la 8-hidroxiquinoleina complejada con Cu(II).
- *Derivados aril-organoestánnicos u organomercúricos*. Grupo principalmente formado por derivados bencénicos de acetatos de Sn(IV) y Hg(II).

En el grupo de los herbicidas nos encontramos con los siguientes tipos de compuestos:

- *Productos inorgánicos*. Generalmente se trata de sales sódicas de diversa índole de las que podemos destacar dos de ellas: el arsenito sódico y el clorato sódico.
- *Productos orgánicos*. Entre estos productos nos encontramos los siguientes grupos:
 - *Derivados de la urea*. Como es el caso del linuron o N'-(3,4-diclorofenil)-N-metoxi-N-metilurea.
 - *Carbamatos y tiocarbamatos*. En los que el grupo carbamato puede estar unido a una cadena lineal, como es el caso del trialato, o bien, a un anillo bencénico como en el clorpropame que es un herbicida regulador del crecimiento de las plantas.
 - *Derivados de heterociclos nitrogenados*. Que es probablemente el grupo más numeroso de todos, encontrándose entre ellos herbicidas tan conoci-

- dos y usados como: atrazina y sus derivados, paracuat, terbacil, amitrol o picloram.
- *Derivados fenólicos*. Como el dinoterbe.
 - *Ácidos orgánicos*. De cadena abierta como es el caso del dalapon que es un 2,2-dicloropropanoico, o de cadena con anillo bencénico como son el dicamba y el 2,4-D.
 - *Nitroanilinas*. Como el butralin.
 - *Benzonitrilos*. Como el ioxinil.
 - *Amidas sustituidas*. Como en el caso de propanil.

En el grupo de los insecticidas también nos encontramos con productos orgánicos e inorgánicos:

- *Productos inorgánicos*. Entre las sales inorgánicas usadas como insecticidas tenemos los siguientes:
 - *Derivados del arsénico* en forma de arseniato de cobre, plomo o calcio, que se utilizan desde hace tiempo como insecticidas y más concretamente para combatir el gusano de la manzana y la pera. Estos insecticidas son del tipo que se denomina de ingestión.
 - *Derivados fluorados*, en forma de fluosilicatos y fluoaluminatos que se utilizan en cebos para insectos y presentan la ventaja de ser poco tóxicos para los cultivos.
 - *Ácido cianhídrico*. De alta toxicidad y que sólo se usa con precauciones extremas en cultivos cerrados.
 - *Otras sales*. Como son sales mercúricas y de níquel cuyo uso es cada vez menos frecuente.

- *Productos orgánicos.* Este grupo de pesticidas es probablemente el más numeroso de todos ellos. Fue Müller el primero en observar que el conocido DDT presenta propiedades insecticidas, investigación por la que recibió el premio Nobel de Medicina, y desde entonces hasta nuestros días son numerosos los productos de síntesis que se utilizan en agricultura. Los principales grupos de insecticidas orgánicos son:
 - *Aceites minerales.* Constituyen un grupo formado por mezclas de hidrocarburos obtenidos del crudo del petróleo y que se vienen usando como insecticidas clásicos de uso muy extendido contra especies tales como las cochinillas. Este grupo se puede subdividir en: aceites parafínicos, olefinicos, aromáticos y nafténicos según la estructura de su cadena.
 - *Derivados organoclorados.* Constituyen un grupo heterogéneo en el que podemos distinguir los siguientes tipos:
 - *Derivados bencénicos.* Entre los que cabe destacar el conocido y ya citado DDT (diclorodifeniltricloroetano) que ocupa un lugar destacado no sólo por ser el primero que se sintetizó, sino por su eficaz contribución en la lucha contra enfermedades transmitidas por insectos, como es el caso del paludismo.
 - *Hexaclorociclohexano.* Comúnmente llamado lindano y que, generalmente es una mezcla de isómeros de los que sólo uno de ellos es activo como pesticida.
 - *Derivados ciclodiénicos.* Dentro de este grupo a su vez, podemos establecer una subdivisión: Derivados del dimetanonaftaleno, entre los que podemos citar insecticidas tan conocidos como aldrin, dieldrin, isodrin y endrin, los derivados del indano como son clordano y heptacloro y en tercer

lugar tenemos los derivados del biclohepteno entre los que se encuentran telodrin, ciclodan, bromodran y endosulfan.

- *Derivados clorados del terpeno.* Como el camfeclor.
- *Derivados fosforados.* Es el grupo de insecticidas que ocupa sin dudas el lugar predominante dentro de los pesticidas más utilizados ya que, a pesar de sus limitaciones, son de los insecticidas más eficaces para luchar contra las plagas de insectos. Químicamente podemos considerarlos como derivados del ácido fosfórico en el que se han sustituidos alguno o algunos de sus grupos atómicos por otros diferentes, dando como resultado la obtención de diferentes tipos de derivados. Los tipos más frecuentes de sustituciones son:
 - *Tionofosfatos.* Son los que han sufrido una sustitución del grupo $P=O$ por el grupo $P=S$, como es el caso del etil-paration ó simplemente paration. Este es un insecticida altamente tóxico inhibidor de la colinesterasa con efecto acumulativo que puede producir, entre otros muchos síntomas, una parada respiratoria.
 - *Fosfonatos.* Que provienen de la sustitución de uno o más grupos $-OH$ del ácido fosfórico por grupos $-OR$ en donde R es un radical orgánico. Es el caso del insecticida diclorvos en el que dos de los grupos $-OH$ han sido sustituidos por dos grupos $-OCH_3$ y el tercero por un grupo $-OCH=CCl_2$.
 - *Tionotiofosfatos.* En los que se ha efectuado una sustitución simultánea de un grupo $P=O$ por un grupo $P=S$ y de un grupo $-OR$ por uno $-SR$.
 - *Derivados clorados o bromados.* En los que la sustitución de grupos $-OH$ se lleva a cabo colocando en su lugar átomos de halógenos tales como cloro o bromo.

- *Amidofosfatos*. Que se originan por sustitución de $-OH$ por $-NH_2$. En algunos casos se trata de derivados en los que se ha sustituido más de un grupo por los correspondientes sustituyentes, dando como resultado otras moléculas más complejas. Estos derivados fosforados son de acción muy eficaz contra pulgones, mosca de la fruta y del olivo, ácaros, gusano del manzano, plagas humanas y del ganado, minadores y cochinillas.
- *Carbamatos*. Es un grupo de insecticidas de enorme interés por su gran actividad biológica que, desde el punto de vista químico, podemos suponer que deriva del ácido carbámico que, aunque no existe en estado libre, su fórmula debería ser $HO-CO-NH_2$. Se conocen derivados del mismo al sustituir los átomos de hidrógeno para formar ésteres. Estos derivados tienen distintos usos según sea la sustitución química efectuada. Así nos encontramos que los carbamatos y tiocarbamatos se suelen utilizar como herbicidas, mientras que los ditiocarbamatos por lo general se utilizan como fungicidas. En el caso de los insecticidas la composición es más variada, de forma que encontramos compuestos con acción insecticida que pertenecen a cualquier grupo químico de los citados. Dentro de este extenso grupo vamos a citar sólo los más conocidos, entre los que sin lugar a duda el carbaril ocupa un lugar destacado. El carbaril es usado para el control de más de 150 tipos de plagas de insecticidas en más de 120 tipos de cultivos. Metiocarb, usado desde 1960 como acaricida, moluscocida e insecticida tanto de ingestión como de contacto. Propoxur utilizado como insecticida no sistémico y tiodicarb utilizado en el control de plagas de lepidópteros, coleópteros y hemípteros en una gran variedad de cultivos, al ser un insecticida de contacto.

- *Extractos de seres vivos.* Existen diversos grupos de pesticidas que se obtienen a partir de seres vivos, que se encuentran química y farmacológicamente relacionados entre sí. Su composición química es muy variable y puede ser desde un simple alcaloide como la nicotina, hasta venenos de tipo proteínico de gran virulencia para los organismos vivos. Dentro de este heterogéneo grupo de sustancias se encuentran los derivados del piretro conocidos y usados como insecticidas antes de la síntesis del DDT. En la actualidad, las sustancias naturales extraídas de las flores del crisantemo han sido sustituidas por derivados sintéticos, químicamente relacionados con el piretro, tales como bartrin, cypermetrin, deltametrin ó fenotrin, de gran eficacia insecticida.
- *Otros insecticidas.* Finalmente nos queda un extenso grupo de sustancias cuya composición química es muy variada, así como su acción frente a los insectos. Dentro de este grupo nos encontramos con sustancias como los insecticidas viróticos, retinoides, atrayentes y repelentes de insectos, hormonas, etc. cuyas acciones no son las específicamente insecticidas.

Uso y modo de actuar de los pesticidas. El uso que se hace de los pesticidas, así como la forma de actuar que estos tienen, depende fundamentalmente de dos factores: fines que se persiguen con su utilización y composición química del pesticida. Para una mejor comprensión vamos a estudiar por separado los tres grupos fundamentales de pesticidas a los que hemos hecho referencia: fungicidas, insecticidas y herbicidas.

Fungicidas. Los tratamientos que se pueden hacer con los fungicidas pueden ser de varios tipos. En primer lugar nos encontramos con los tratamientos *preventivos* encaminados a evitar el desarrollo de hongos sobre determinados tipos de células,

en segundo lugar tenemos los tratamientos para *erradicar* hongos cuando aparecen síntomas de infección, en tercer lugar tenemos los tratamientos *curativos* encaminados a acabar con la plaga de hongos una vez que esta se ha producido y finalmente, nos encontramos con los tratamientos *antiesporulantes* cuya misión es impedir la diseminación y propagación de las esporas reproductoras de los hongos. En cada caso, habrá que utilizar el producto de composición adecuada para conseguir los fines perseguidos. Dependiendo de su composición química la forma de actuar del fungicida será diferente. Vamos a reseñar brevemente cuales son las formas de actuación más frecuentes.

El desarrollo de un hongo en una planta, por lo general, consta de varias etapas: contacto entre la planta y la espora; germinación de la espora; introducción de la espora a través de la pared epidérmica de la planta y, finalmente, desarrollo del *micelium*. Los fungicidas pueden actuar en cualquiera de estas fases según sea su composición, y su acción será diferente dependiendo del momento en el que actúa. Por tanto, se pueden estimar dos tipos de acción: acción directa que será aquella que ejercen los fungicidas que actúan directamente sobre los parásitos acabando con su desarrollo y acción indirecta que será la que ejerce el fungicida que actúa a través de la planta afectada estimulando sus defensas, desactivando los metabolitos emitidos por el parásito o inhibiendo su actividad.

En el caso de fungicidas de acción directa, esta puede consistir en alguna, o algunas, de las siguientes formas de actuar: disminución de la producción de energía del hongo, perturbación de la biosíntesis de sus proteínas o ácidos nucleicos ó modificación de la permeabilidad de sus membranas celulares. Por ejemplo, en este último caso, nos encontramos con determinados compuestos organofosforados que actúan inhibiendo la síntesis de la quitina en el hongo mientras que son inactivos con la planta huésped.

Insecticidas. En el caso de los insecticidas, la clasificación que podemos establecer es la siguiente:

- Desde el punto de vista funcional: a) Insecticidas que actúan a través del tubo digestivo ó insecticidas de ingestión; b) Los que actúan por contacto al ser absorbidos por la cutícula, dado su carácter liposoluble y/o volátil; c) Los que actúan por inhalación y se difunden en la hemolinfa, gracias a su carácter gaseoso.
- Desde el punto de vista de la actuación sobre la planta, podemos clasificar los insecticidas en: a) los que quedan en la superficie de la planta, que son los insecticidas de contacto y b) los que penetran en la planta que son los insecticidas endoterápicos o sistémicos. Los primeros limitan su acción a las zonas de la planta que está cubierta con el producto, mientras que los segundos ejercen una protección más eficaz al ser transportados por la savia a todas las partes de la planta.
- Desde el punto de vista del modo ó mecanismo de acción sobre el insecto, la clasificación puede hacerse de la siguiente forma:
 - Productos que actúan sobre el sistema nervioso del insecto.
 - Productos que actúan sobre los mecanismos de producción de quitina.
 - Mediadores químicos que actúan sobre las comunicaciones químicas entre ellos y la planta.
 - Productos que actúan sobre la cadena de los transportadores de electrones.
 - Esterilizantes.
 - Productos sinérgicos que prolongan o intensifican la acción de otros insecticidas. Por ejemplo, los insecticidas organoclorados y los derivados de la piretrina, actúan perturbando la conexión entre las neuronas del sis-

tema nervioso, mientras que los carbamatos y los organoclorados suelen actuar inhibiendo la acetilcolinesterasa.

Herbicidas. En el caso de los herbicidas, como en los anteriores, también podemos distinguir *a priori* dos grupos: los de contacto y los sistémicos. Los primeros actúan directamente destruyendo la planta, o la parte de ella con la que entra en contacto directo, como es el caso del H_2SO_4 , mientras que los segundos actúan perturbando una o más de las funciones fisiológicas que garantizan el normal funcionamiento de la planta. En este segundo caso la acción del herbicida sistémico supone dos etapas: penetración del mismo en la planta y actuación sobre alguno de sus procesos bioquímicos. Durante la primera etapa, el pesticida aplicado a las hojas o tallos de la planta, tiene que atravesar la cutícula cerosa de la epidermis vegetal que está formada por sustancias hidrófobas, generalmente ésteres de ácidos carboxílicos y alcoholes de largas cadenas carbonadas o esteroides, que impiden el paso de las especies químicas polares pero son permeables a las sustancias lipídicas, de ahí la necesidad de usar los llamados coadyuvantes que son sustancias que favorecen la solubilización en las ceras cuticulares de la planta. Una vez atravesada la cutícula, el herbicida se encuentra con la pared celular formada por celulosa y recubierta de pectinas. Para atravesar esta segunda capa, el herbicida deberá tener un cierto carácter polar y de ahí que estos productos presenten un doble carácter hidrófobo e hidrófilo para poder penetrar al interior de la célula.

Ventajas e inconvenientes del uso de pesticidas. Aunque el uso masivo e incontrolado de pesticidas puede acarrear graves problemas, no hemos de olvidar que, a lo largo de la historia reciente, los pesticidas han aportado también una serie de ventajas entre las que cabe destacar las siguientes:

1. Aumento de los rendimientos en los cultivos y explotaciones agropecuarias. Durante la década transcurrida entre 1975 y 1985 la producción de trigo en países como India y China, pasó de 15 a 66 quintales métricos por hectárea, gracias al uso masivo de pesticidas y fertilizantes que, hasta entonces, no se habían introducido en los cultivos tradicionales de estos países. Este aumento de rendimiento en los cultivos evidentemente puede suponer un remedio para acabar con el hambre, ahora bien, las causas por las que en la actualidad existen más de 500 millones de seres humanos que padecen *hambre crónica* en el mundo no sólo radican en la producción sino que, como argumentan los detractores de los pesticidas, hay que buscarlas en la mala distribución de los recursos.
2. Protección de las reservas alimentarias. Mundialmente, las pérdidas producidas por roedores, hongos, insectos y demás plagas en las reservas alimenticias, dependiendo de la región geográfica, del área cultural y de la economía del país, pueden suponer entre un 30% y un 46 % de la cosecha si no se utilizan pesticidas para salvaguardarla.
3. Limitación de las irregularidades en la producción agrícola debidas a la aparición de plagas de parásitos. Históricamente, han ocurrido catástrofes debidas a la aparición de determinadas plagas que han entrañado, no sólo graves quebrantos para la economía de un país o una región, sino incluso espectaculares aumentos en los índices de mortandad en la población humana. A modo de ejemplo, cabe citar la tristemente célebre hambruna que ocurrió en Irlanda entre los años 1845 y 1849 que condujo a la muerte a un 12% de la población y obligó y a la emigración de más de un millón de irlandeses, todo ello debido a la aparición de un hongo parásito de la patata que se desarrolló de forma incontrolable debido a unas condiciones meteorológicas determinadas. Estas

condiciones meteorológicas volvieron a reproducirse en Irlanda en el año 1983, pero en este caso el uso de fungicidas evitó que se produjera una catástrofe semejante a la del siglo pasado.

4. Lucha contra los vehículos de transmisión de enfermedades cuya propagación tiene lugar a través de insectos, roedores, u otros. En este apartado es destacable el caso de la enfermedad infecciosa conocida como malaria o paludismo, transmitida por la picadura del mosquito *anopheles* que se desarrolla en áreas de clima tropical. Se ha estimado que durante la primera mitad del presente siglo, cada año, 300 millones de personas contrajeron la malaria y de ellos fallecieron 3 millones. El uso del conocido DDT para eliminar al vehículo transmisor de la enfermedad hizo que los casos de contagio en la zona del canal de Panamá pasasen del 82,1 % de la población, durante la primera década del siglo, al 7,6 % de la actualidad.
5. Lucha contra los parásitos productores de toxinas. Determinados parásitos del hombre, los animales y las plantas, principalmente los ácaros, y determinados arácnidos, no sólo son los causantes de molestias puntuales en los animales de sangre caliente, sino que, a veces, pueden producir intoxicaciones cuya repercusión es mayor que la simple molestia producida por su picadura.
6. Protección de especies vegetales, generalmente árboles, que a veces se han visto en peligro de extinción a causa de hongos o insectos. Es el caso de la grafiosis del olmo o la procesionaria del pino que ponen en peligro la existencia de grandes extensiones de bosques.

Junto a estas ventajas el uso indiscriminado y no controlado de pesticidas presenta una serie de inconvenientes que se pueden resumir en una sola frase: son sustancias altamente tóxicas para la salud del hombre, de los animales y de las

plantas que entran en la cadena alimentaria y constituyen, en muchos casos, un serio peligro para el ambiente.

En determinados casos sus efectos nocivos no se manifiestan de forma inmediata y solo aparecen cuando su uso ha sido intensivo, a veces abusivo, y durante décadas, lo cual supone un peligro adicional derivado de su utilización. Por consiguiente, el uso de pesticidas no se restringe al daño o toxicidad que estos presentan para las personas (fabricantes, almacenistas, transportistas, agricultores, etc.) que accidentalmente entran en contacto directo con estos compuestos químicos, en cuyo caso se pueden presentar intoxicaciones más o menos agudas, sino que incluye los efectos que a corto o largo plazo puedan producir sobre las personas que no están directamente relacionados con ellos.

Los pesticidas se usan no solo durante el proceso de cultivo de los alimentos sino también durante su almacenamiento y transporte. Todo ello hace que estos compuestos se introduzcan en la cadena alimentaria y queden como residuos en los alimentos que ingerimos. Esta ingestión lenta pero continuada de pesticidas pueden dar como resultado la aparición de una enorme problemática de toxicidad crónica que se traduce en problemas de neurotoxicidad, teratogénesis, carcinogénesis ó problemas de metabolismo o hipersensibilidad, por citar sólo los casos más conocidos. En este aspecto es muy conocido el caso de DDT que sólo a partir de los años setenta se pudo constatar que, debido a la persistencia de sus moléculas, su falta de selectividad y su gran capacidad para acumularse en los organismos vivos, produjo la desaparición de determinadas especies útiles, desequilibrio en los sistemas ecológicos y aparición de cepas resistentes al producto. Más recientemente, se está constatando la resistencia que las plantas adventicias están desarrollando a la acción de los herbicidas, aunque la acción de estos sobre los or-

ganismos vivos sigue siendo nociva al llegar al hombre a través de la cadena alimentaria.

Tipos de toxicidad de los pesticidas

De acuerdo con lo anterior, la toxicidad de un pesticida se puede establecer a partir de dos criterios diferentes pero complementarios: la naturaleza del daño causado y/o la duración del mismo. De acuerdo con la naturaleza del daño causado podemos hablar de toxicidad en sentido estricto, o sea capacidad del tóxico para producir la muerte del ser vivo, y toxicidad en un sentido más específico para referirnos a la capacidad de producir daño sobre determinados tejidos, órganos, o sistemas del animal. En el caso de producir la muerte inmediata del individuo diremos que se trata de toxicidad aguda, bien sea oral o dérmica, y en el segundo caso diremos que se trata de toxicidad crónica.

En cuanto a la duración del daño causado -descartado el caso de muerte inmediata del individuo- hay que tener en cuenta dos aspectos: 1º) Los factores que determinan la cronicidad del daño que son: la naturaleza del compuesto, la dosis y la duración de la dosis y 2º) La reversibilidad del daño.

La toxicidad de un compuesto químico, de acuerdo con la naturaleza del daño causado, puede ser:

- *Toxicidad aguda*, que a su vez puede ser:
 - *Toxicidad oral aguda*. Mediante este término nos referimos al efecto tóxico producido por la ingestión, en una sola vez, del producto tóxico, por lo que suele medirse en forma de la denominada *dosis letal media*, abreviado DL-50, que se define como: la cantidad de producto que es necesario ingerir de una sola vez para producir la muerte inmediata del 50% de los animales de ensayo. La cuantificación de este parámetro se suele expresar en miligramos de

producto tóxico por cada kilogramo de peso del animal. Extrapolando los resultados obtenidos con animales de laboratorio de diferentes especies podemos establecer la dosis media letal para los humanos que sólo tendrá un valor estimativo, dado que los efectos producidos por el pesticida no son exactamente iguales para todas las especies animales.

- *Toxicidad dérmica aguda.* Este parámetro se obtiene aplicando dosis de pesticida, de diferente cuantía, sobre la piel de los animales de ensayo, observando los efectos producidos y extrapolando los valores obtenidos al caso del hombre. Al igual que la toxicidad oral aguda se expresa en forma de dosis letal media que cuantifica los miligramos de sustancia tóxica por kilogramo de peso del animal, necesarios para producir la muerte del mismo por absorción a través de la piel.
- *Toxicidad crónica.* En este caso lo que observamos como parámetro indicador de la toxicidad del pesticida, no es el efecto inmediato -muerte del animal- sino la toxicidad desarrollada a través de un período de tiempo determinado, tras la ingestión periódica de pequeñas dosis del pesticida. La duración de los períodos de tiempo de ensayo suele ser dos años, aunque también es cierto que, en ocasiones, los ensayos se han efectuado durante períodos de varios meses (seis meses o tres meses) e incluso se han llevado a cabo ensayos que sólo han durado una o dos semanas. En estos últimos casos, los resultados de las pruebas se suelen expresar como toxicidad subcrónica.

El objetivo final de este tipo de estudios es establecer lo que se denomina el *nivel sin efecto* del pesticida que no es más que una estimación de la cantidad de pesticida que puede ser ingerida por un animal en su dieta diaria, durante un período de tiempo predeterminado, sin que se produzca ningún efecto dañino ni anomalía en su estado de salud. Por lo tanto se medirá en miligramos

de sustancia tóxica por kilogramos de dieta ingerida diariamente. No obstante, la ingestión prolongada de pesticida en cantidades inferiores a su nivel sin efecto, no garantiza la no toxicidad del mismo ya que los efectos a largo plazo, como pueden ser trastornos en el crecimiento o en la reproducción de la especie, no son conocidos hasta que transcurran períodos de tiempo suficientemente largos como para poder observar y cuantificar los efectos producidos por la utilización del compuesto tóxico.

Sin embargo, estas formas básicas de expresar la toxicidad general de un determinado pesticida, no son las únicas que podemos utilizar en el estudio de sus características ya que deben ser complementadas con otros parámetros de toxicidad más específicos que hacen referencia a los efectos que un determinado pesticida puede desencadenar sobre órganos específicos de una especie animal, o sobre la propia especie en concreto, originando una toxicidad crónica. Así, podemos obtener datos acerca de efectos tóxicos de un pesticida sobre el sistema nervioso, la piel, los ojos, el sistema respiratorio, etc. Los tipos de *toxicidad crónica específica* más frecuentes suelen ser los siguientes:

- *Neurotoxicidad* o toxicidad sobre el sistema nervioso. Que se determina estudiando los efectos que produce el pesticida sobre las aves por ser estas las especies más sensibles a este tipo de efectos.
- *Toxicidad sobre la piel y los ojos*. Que no hay que confundir con la anteriormente citada toxicidad dérmica ya que, en este caso, se refiere a las irritaciones oculares, o en la piel, producidas por el efecto del pesticida, que pueden existir aunque la toxicidad dérmica se encuentre dentro de valores aceptables.
- *Teratogenia y reproducción*. Para efectuar estos estudios de influencia que pueden ejercer los pesticidas sobre la reproducción y crecimiento de las especies animales, se utilizan ratas de laboratorio, por ser especies que se repro-

ducen rápidamente y permiten estudiar el efecto que produce el pesticida sobre tres generaciones consecutivas, comparando los efectos producidos con otras tres generaciones de ratas que no han sido sometidas a la dieta que contenía el compuesto tóxico.

- *Mutagénesis*. Estas pruebas de laboratorio se realizan mediante *ensayos* específicos que determinan el efecto mutagénico del pesticida sobre determinados microorganismos tales como bacterias (*Salmonella typhimurium* o *Neurospora crassa*), células mamarias *in vitro*, o sobre insectos (*Drosophila melanogaster*) dada la rapidez con la que se reproducen. Los tests presentan además las ventajas de bajo costo, sensibilidad y simplicidad.
- *Toxicidad por inhalación*. Expresa la dosis letal media del producto tóxico cuando este se introduce en el organismo del animal a través de la respiración, aunque también existen tests en los que se miden los efectos no letales de los pesticidas sobre el sistema respiratorio.

Para ello se encierra al animal en un recinto cerrado de un volumen determinado, durante un período de tiempo previamente establecido y con una atmósfera que contiene el producto en una concentración fijada de antemano. Los resultados se expresan en miligramos por metro cúbico del recinto y hay que especificar el tiempo invertido y el peso del animal.

- *Reversibilidad*. El término *reversibilidad de envenenamiento* mediante una sustancia tóxica, está sujeto a numerosas interpretaciones. Un proceso tóxico es reversible si los daños causados cesan totalmente al transcurrir un período de tiempo aceptable. Ahora bien, nunca podemos asegurar que las lesiones producidas por un determinado producto tóxico van a ser reversibles puesto que en casos de envenenamiento severo, cualquier pesticida puede causar lesiones irreversibles. Aunque la mayoría de los pesticidas producen efectos re-

versibles, si la dosis es inferior al valor de la DL-50, sin embargo, hay que tener en cuenta otra serie de factores que pueden concurrir ocasionalmente para producir efectos irreversibles. Las principales causas son el efecto acumulativo del pesticida en determinados tejidos del ser vivo y la presencia de otros pesticidas que pueden potenciar la acción del primero.

- *Toxicidad de mezclas de pesticidas.* La toxicidad de una mezcla de pesticidas, obviamente es función de la toxicidad de sus componentes y, en la mayor parte de los casos estudiados, es proporcional al porcentaje de cada componente en la mezcla e inversamente proporcional a su dosis letal media. Así, para una mezcla de componentes activos (A, B, ...N) cuyas DL-50 agudas son L_A, L_B, \dots, L_N , podemos escribir:

$$100/L_m = a/L_A + b/L_B + \dots + n/L_N$$

en donde a, b, ...n son los porcentajes de los respectivos componentes activos en la mezcla. Sin embargo, como se ha apuntado anteriormente, hay casos conocidos en los que la acción de un determinado pesticida de la mezcla se potencia o se deprime por la presencia de los demás componentes, en cuyo caso la determinación de la dosis letal media de la mezcla (L_m) se obtiene de forma empírica.

Aunque todos estos parámetros de toxicidad de los pesticidas son totalmente necesarios para conocer sus posibles efectos en caso de accidentes en personas que están en contacto constante con ellos, sin embargo, al consumidor de alimentos o productos presuntamente contaminados con pesticidas, lo que realmente le interesa es conocer los daños que pueden causarle los residuos de pesticidas, o de productos derivados de su degradación, que puedan quedar en los mismos como consecuencia de una eliminación parcial. La ingestión continuada de estos alimentos, que no portan dosis letales pero sí residuos del pesticida, pue-

de ocasionar daños o trastornos que desemboquen en una toxicidad crónica de sintomatología no conocida ni definida.

Es por ello que se ha intentado establecer una normativa mundial que defina cuáles son los límites máximos tolerables para que los efectos producidos sean nulos o mínimos. Con esta finalidad se han definido los denominados *Límites Máximos de Residuos (LMR)* entre los que hemos destacado los siguientes:

- *Ingestión diaria admisible (IDA)*: definida como la cantidad máxima de producto tóxico que, ingerida diariamente durante toda la vida, parece no presentar riesgos para el individuo, tomando como punto de partida los datos conocidos en este momento. Para obtener el valor numérico de este parámetro vamos a definir previamente el *Nivel Sin Efecto (NSE)* que es la cantidad de producto tóxico que puede ser ingerido en una dieta diaria, sin que se produzca ningún efecto tóxico o dañino, ni anomalía en el estado de salud del individuo, durante la duración del ensayo. Dividiendo el NSE, expresado en miligramos de producto tóxico por kilogramo de peso del animal y día, entre el denominado factor de seguridad F que tendrá un valor de cien en casi todos los pesticidas excepto en aquellos cuya toxicidad sea superior a la normal, se obtiene el valor del IDA.

Una vez conocido el valor del IDA podemos calcular el valor del límite máximo de residuos (LMR), multiplicando el valor del IDA por el peso medio de una población de individuos y dividiendo por el peso medio de alimentos ingeridos por día. Evidentemente este valor de LMR, por razones obvias, variará de un país a otro.

- *Plazo de seguridad*. Otro dato representativo de la seguridad sanitaria de los alimentos que han sufrido tratamientos con pesticidas, es el denominado plazo de seguridad que expresa el tiempo en días que debe transcurrir entre la

última aplicación del pesticida y la recolección del producto para su consumo. Obviamente, este plazo de seguridad está relacionado con las características químicas del producto en cuestión, ya que de ellas dependerá su degradación y, en consecuencia, su pérdida de toxicidad, suponiendo, claro está, que el producto de degradación no sea tóxico cosa que no siempre es cierta. Para establecer este plazo de seguridad se estudian las curvas de degradación del pesticida en el alimento a lo largo de tiempo, hasta que la cantidad presente del mismo sea inferior a la establecida por el LMR.

Degradación de los pesticidas.

Los compuestos orgánicos en general, y los pesticidas en particular, suelen sufrir cambios en su composición química cuando se exponen a la acción de agentes físicos, químicos o biológicos tales como radiación solar, calor, humedad, oxígeno atmosférico o enzimas de plantas o microorganismos, estos últimos como consecuencia de su metabolismo. Estos cambios químicos se acentúan cuando, como ocurre en los pesticidas, se encuentran depositados en forma de finas películas o capas sobre la superficie de la planta y en contacto directo con los agentes externos mencionados.

Teniendo en cuenta la naturaleza del agente productor del cambio químico podemos hablar de dos tipos fundamentales de degradación: *degradación fisico-química* y *degradación bioquímica*.

Degradación fisico-química. El principal agente fisico-químico responsable de la degradación de los pesticidas, y a la vez el más estudiado, es la radiación solar, de ahí que hablemos de fotodegradación o degradación fotoquímica de los pesticidas para referirnos a los cambios químicos que sufre el pesticida al ser expuesto a la acción de la luz y el calor.

Los efectos que la luz y el calor producen sobre los pesticidas dependen de varios factores entre los que destacaremos la naturaleza química del pesticida, el estado de agregación en el que se encuentra, la longitud de onda de la radiación y la presencia de otros pesticidas o productos químicos (disolventes, aceites, etc.) ya que estos productos pueden actuar como fotosensibilizadores al formar compuestos intermedios que reaccionen con el pesticida en su estado normal o fotoexcitado. Las reacciones inducidas por la radiación ultravioleta son fundamentalmente de cuatro tipos: sustituciones en cadenas cíclicas, polimerizaciones, hidrólisis y oxidaciones.

En este aspecto son de resaltar los estudios llevados a cabo por Matsumura [1] y J. Mitchel [2] sobre un conjunto de 141 pesticidas en los que se pone de manifiesto la degradación sinérgica de uno o ambos componentes en mezclas formadas por dos pesticidas (DDT y fenotiazina o temefos y dieldrin, por ejemplo) o bien, la degradación del pesticida que tiene lugar por la acción del disolvente o cualquier otro compuesto que le acompañe en la formulación comercial del mismo, como es el caso de la descloración fotoquímica que sufre el munoron en presencia de metanol.

Como ejemplo de reacción de oxidación podemos citar los casos de hidroxilación del carbaril para formar 4-hidroxil-1-naftil-N-metilcarbamato o la pérdida de azufre que se produce en el paration dando *p*-nitrofenol o paraoxon. Este mismo compuesto, paration, también puede sufrir una reducción del grupo nitro de su molécula para formar aminoparation.

Degradación bioquímica. Este término suele utilizarse en el caso de reacciones de degradación de pesticidas en las que interviene directa o indirectamente un ser vivo. Estas biotransformaciones, en la mayoría de los casos estudiados, no son reacciones producidas en una sola etapa sino que son el resultado de numerosas reac-

ciones sucesivas que tienen lugar bien en el interior del organismo vivo, o bien, en el exterior al actuar sobre el pesticida un enzima segregado por él.

En estudios acerca de este tipo de degradaciones J. Williams [3] sugiere que el mecanismo de degradación de los compuestos xenobióticos transcurre en dos fases: en una primera fase las reacciones que suelen producirse son hidrólisis, oxidaciones o reducciones, mientras que en la segunda fase las reacciones predominantes son aquellas en las que los productos procedentes de la primera se combinan entre sí o, lo que es aún más frecuente, con productos procedentes del ser vivo para formar compuestos hidrosolubles que son eliminados por este. En esta conjugación con productos del ser vivo, la sustancia tóxica reacciona generalmente con N-acetilcisteína para formar ácidos mercaptúridos, con ácido glucorónico formando glucorónido derivados, con glicina para formar ácidos hipúricos o con glutamina para formar derivados. En cualquier caso las reacciones siempre son de gran complejidad y no transcurren en una sola etapa sino a través de la formación de intermedios.

ANÁLISIS DE PESTICIDAS

A través de la introducción precedente acerca de los pesticidas, su uso y las reacciones de degradación que pueden sufrir, así como de las consecuencias nocivas que se pueden generar, por su mal uso, y del control que hay que ejercer para evitar posibles intoxicaciones, se deduce fácilmente que el análisis de componentes activos de formulaciones de pesticidas es absolutamente indispensable en la actualidad. Ahora bien, el análisis de pesticidas presenta varias características que, en cierto modo, lo diferencian del análisis de otros analitos. Estas características son:

- Escala del análisis que, salvo en el caso de formulaciones comerciales de pesticidas, se tratará de análisis de trazas.
- Diversidad de la naturaleza química de los analitos. Como hemos visto al estudiar la clasificación química de los pesticidas, la naturaleza química es muy diferente de unos pesticidas a otros lo que obliga a utilizar métodos de análisis de muy diversa índole.
- La complejidad y diversidad de las matrices en las que podemos encontrar restos de pesticida (aguas, alimentos, suelos, tejidos animales o vegetales, fluidos biológicos, etc.).
- La presencia de posibles productos de degradación del pesticida, que, en ocasiones, son de toxicidad igual o superior a la del propio pesticida.

De entre todos los contaminantes orgánicos, tal vez son los pesticidas los que han recibido mayor atención. Su demostrada toxicidad y elevado uso en todo el planeta, así como las posibilidades de contaminación directa en productos de consumo humano, tales como alimentos, aguas, etc., son, sin duda, las causas de su carácter prioritario como contaminantes a controlar. La problemática del análisis de residuos de plaguicidas no se diferencia significativamente de la de cualquier otro tipo de contaminante orgánico. Pero, y como antes se ha dicho, a diferencia del resto de familias de contaminantes, su diversidad química es mucho más amplia. Ello hace que se requieran numerosos métodos analíticos para su determinación al nivel de residuos y que, en la actualidad, sea necesaria realizar investigación con el fin de mejorar los métodos existentes o proponer nuevos métodos que satisfagan las demandas de la sociedad.

La mayoría de métodos analíticos para la determinación de residuos de plaguicidas aplican una primera etapa consistente en la extracción de los plaguicidas presentes en la muestra, separándolos de otras sustancias presentes. En esta

etapa se consigue no solo su separación de la matriz original sino también su pre-concentración, lo cual es fundamental dados los bajos niveles de concentración en que se encuentran. Si se exceptúan los compuestos más volátiles, que suelen separarse en fase gaseosa, la mayoría de los procedimientos de extracción están basados en el uso de disolventes adecuados (extracción líquido-líquido, extracción sólido-líquido) o bien en la adsorción sobre sólidos (extracción en fase sólida con cartuchos, discos u otros).

A pesar de la separación de los analitos de la matriz original de la muestra y del uso de técnicas cada vez más selectivas, en la práctica se comprueba que suele ser necesaria una etapa adicional de purificación (clean-up) para la eliminación de los interferentes coextraídos previamente a la determinación. Esta etapa de purificación depende fundamentalmente del tipo de muestra. En este sentido, las más problemáticas son las muestras de organismos marinos y algunos tipos de alimentos tales como trigo o productos lácteos, por la elevada cantidad de lípidos coextraídos, que suelen producir una elevada interferencia en el análisis. Esta etapa persigue además otras finalidades diferentes de la eliminación de interferencias como son la rebaja de los límites de detección, mejora de la identificación de sustancias y alargamiento del tiempo de vida de instrumentos y componentes de los mismos.

Como acabamos de comentar, la escala del análisis al nivel de trazas obliga a utilizar técnicas analíticas de gran sensibilidad, o bien a llevar a cabo un proceso de preconcentración del analito, si la técnica seleccionada no presenta la sensibilidad apropiada para efectuar el análisis directamente. Por otra parte, la complejidad de las matrices en las que normalmente se encuentra el analito nos obliga a efectuar separaciones y/o extracciones previas a la etapa de medida, o bien, a utilizar técnicas de una gran selectividad que nos permitan medir la señal

analítica en presencia de los posibles interferentes que en la matriz se encuentren y, finalmente, al tener que analizar el pesticida en presencia de alguno de sus productos de degradación u otros pesticidas o productos concomitantes. Evidentemente, la elección de la técnica analítica adecuada dependerá del problema concreto que se nos presente y tendremos que efectuar la elección en función de las consideraciones anteriores.

En la actualidad, las técnicas más utilizadas en el análisis de pesticidas, tanto en su aspecto identificativo como en el cuantitativo, son: cromatografía (de gases, líquida, de fluidos supercríticos y en capa fina), fluorescencia y espectrofotometría UV-VIS (en determinados casos y principalmente como técnica de detección en diferentes cromatografías) y muy recientemente la electroforesis capilar con la que se están obteniendo buenos resultados.

Cromatografía de gases (CG).

La cromatografía de gases con detectores tales como espectrometría de masas, captura electrónica, fotometría de llama o de conductividad, es una de las técnicas analíticas que permite tanto la detección como la determinación de pesticidas siempre que estos presenten suficiente volatilidad y estabilidad térmica o, en caso contrario, permitan obtener algún derivado que presente dichas propiedades. Esta técnica, al ser una técnica separativa, cumple el requisito de selectividad exigido en el análisis de pesticidas aunque su sensibilidad dependerá del tipo de columna utilizada y sobre todo del detector empleado para la cuantificación del analito. Recientemente, la incorporación de columnas capilares con fases estacionarias cada vez más específicas y la utilización de detectores de masas permite no sólo la cuantificación sino también la identificación del analito con un nivel de seguridad. En la tabla I.1 hemos incluido un resumen de los detectores

más utilizados en cromatografía de gases, junto con los límites de detección que se pueden conseguir y los productos a los que se suele aplicar.

Tabla I.1. Sensibilidad y aplicaciones más frecuentes de la cromatografía de gases para el análisis de pesticidas.

Detector	Átomo funcional	LD (pg/sec)	Ejemplos
Conductividad	Cl y N	0,5 y 1,0	Halogenados, carbamatos y nitroderivados
Fotometría de llama	P y S	0,2 y 4,0	Organofosforados y carbamatos con S
Ionización	P y N	0,02 y 0,2	Organofosforados carbamatos y nitroderivados
Captura electrónica	Halógenos y nitroderivados	0,05 y 0,5	Organoclorados y nitroderivados
Espectrometría de masas	No polares	5 a 50 ng·L ⁻¹	Atrazinas y cloroderivados

Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR).

La CLAR se aplica al análisis de pesticidas desde 1971 en que R.A. Henry y col.[4] la utilizaron para la determinación de *abate* en aguas alcanzando un límite de detección de 0,05 mg·L⁻¹. La utilidad de esta técnica para el análisis de pesticidas es manifiesta si tenemos en cuenta que, junto a su selectividad como técnica separativa que es, podemos alcanzar una gran sensibilidad utilizando diferentes tipos de columnas, fases móviles y detectores. Por otra parte, esta técnica, no tiene *a priori* el inconveniente que presenta la CG en la cual el producto ha de ser volátil y térmicamente estable. Todo ello ha favorecido el desarrollo de numerosos métodos de análisis por CLAR utilizando detectores muy variados, entre los que cabe destacar: fluorescencia, espectrofotometría UV-VIS, electroquímicos y espectrometría de masas, como más frecuentes. Los límites de detección alcanzados, como podemos ver en la tabla I.2, oscilan entre 0,1 y 500 µg·L⁻¹ dependiendo

del detector utilizado, del tipo de columna, del eluyente y, en cierto grado, de la matriz de la muestra.

Tabla I.2. Tipo de detector, sensibilidad y aplicaciones más frecuentes de la CLAR en el análisis de pesticidas.

Detector	Grupo funcional	L.D. $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	Aplicaciones
Fluorescencia	Fenoles y carbamatos aromáticos	80,0 y 0,1	Pesticidas con anillos aromáticos
UV convencional	Carbamatos y nitroti derivados	100,0 y 1,0	Fenilureas, fenoxiácidos, carbamatos
Diodos en fila	Fenoles	20,0	<i>o</i> -fenilfenol
Electroquímico	Carbamatos y fenoles	100,0	<i>o</i> -fenilfenol y algunos carbamatos
Espectrometría de masas	Derivados de triazinas	0,01-0,03	Atrazinas

Cromatografía en capa fina (CCF).

La cromatografía en capa fina es una técnica analítica que goza de unas especiales características que la hacen útil para el análisis de pesticidas ya que presenta una buena selectividad, una gran sencillez, un bajo costo y una sensibilidad más que aceptable gracias a la disponibilidad de modernos detectores. No obstante su uso ha disminuido paralelamente al incremento del uso de GC y CLAR. Todo ello contribuye a que, desde 1954 en que Kirchner y col. [5] la utilizaron para determinar residuos de bifenilo en cítricos, hasta nuestros días, hayan sido numerosos los trabajos publicados acerca de análisis de pesticidas utilizando CCF. En la tabla I.3 hemos incluido algunas de las aplicaciones más conocidas, en las que el soporte frecuentemente utilizado es sílice.

Los sistemas detectores más utilizados son: reflectancia ultravioleta-visible, fluorescencia *in situ*, tanto si el compuesto presenta fluorescencia natural

como mediante reacciones de derivación o de formación de quelatos y otras técnicas entre las que podemos destacar la utilización de enzimas, con las que se impregnan las cromatoplasas en forma de aerosol, para la detección visual tras comparación con una escala, o la utilización isótopos trazadores como es el caso de la determinación por conteo de ametrin con C-14.

Tabla I.3. Sensibilidad y aplicaciones más frecuentes de la CCF en el análisis de pesticidas.

Detector	Grupos funcionales	L.D.	Aplicaciones
Fluorescencia natural	Fenoles, nitro- y tio derivados aromáticos	$> \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	Tiabendazol, benomilo, quinometionato
Fluorescencia previa derivación	Derivados de amino ó hidroxilo, NH_2 , -OH	$> 0,2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	Carbamatos y triazinas
Enzimas (detección visual)	Derivados de la triazina	----	Atrazina y ametrin
Reflectancia UV	Clorados y fosfoderivados	$1,0 \mu\text{g}/\text{sec}$	s-triazinas, carbamatos

Técnicas luminiscentes.

Aunque existen algunos métodos de análisis de pesticidas utilizando técnicas fosforescentes, sin embargo una de las técnicas más utilizadas, tanto en sí misma como constituyendo el sistema detector en técnicas cromatográficas, es la espectrofluorimetría. El uso rutinario de esta técnica, en su forma convencional, o en cualquiera de sus modalidades (derivada, sincrónica, de ángulo variable, derivadas, etc.) en el análisis de pesticidas se debe fundamentalmente a una de sus cualidades más destacables: la gran sensibilidad que presenta ya que nos permite alcanzar límites de detección inferiores a los microgramos/litro. Por el contrario, junto a su gran sensibilidad presenta como principal inconveniente su mediana

selectividad, dado que son muchos los pesticidas que poseen en su molécula grupos aromáticos capaces de emitir fluorescencia dando lugar a interferencias por solapamiento de espectros que a veces no son fáciles de soslayar. Ahora bien, con la llegada de la instrumentación comandada por ordenador, que permite obtener espectros de luminiscencia total, de fluorescencia sincrónica convencional, sincrónica de ángulo fijo y sincrónica de ángulo variable y el desarrollo de sofisticados métodos de calibración para el tratamiento de la señal analítica, la espectrofluorimetría en disolución se ha convertido en una de las herramientas más útiles en el análisis de pesticidas.

Los métodos espectrofluorimétricos de análisis de pesticidas los podemos clasificar de acuerdo con dos criterios: el primero se basa en el tipo de comportamiento fluorescente del analito y el segundo tomando como criterio clasificador la fase en la que se efectúan las medidas. De acuerdo con el primer criterio nos encontramos dos opciones: *métodos directos* que serán aquellos que se basan en la medida de la fluorescencia intrínseca del analito y *métodos indirectos* en los que el analito no presenta fluorescencia intrínseca y tiene que ser producida mediante una reacción, bien para formar un compuesto que sea fluorescente, o bien para incorporar un reactivo que sea fluorescente. En cuanto al segundo criterio, es decir, teniendo en cuenta la fase en la que se encuentra el analito, en el momento de la medida de la señal analítica, podemos hablar de *métodos en disolución* y *métodos en fase sólida*.

Tanto en un caso como en otro siempre tendremos la posibilidad de utilizar los diferentes tipos de señales fluorescentes (sincrónica de ángulo fijo, sincrónica de ángulo variable, etc.) así como los diferentes tipos de calibración para el tratamiento de la señal obtenida, cuando se nos presenten interferencias espectrales

debidas a la presencia de otros pesticidas o componentes de la muestra que muestren fluorescencia en la zona en la que la exhibe el pesticida en cuestión.

Como podemos apreciar en la tabla I.4 los métodos directos en disolución, que sólo son aplicables en los casos en los que el pesticida presente fluorescencia intrínseca, cosa no muy frecuente. Utilizando diferentes disolventes se pueden determinar residuos de pesticidas a nivel de trazas en diversas matrices, alcanzándose límites de detección del orden de los $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Modos de aumentar la fluorescencia del pesticida.

En algunos casos la fluorescencia del pesticida aumenta apreciablemente utilizando sistemas organizados como las α - o β -ciclodextrinas que forman complejos de inclusión con el pesticida.

Tabla I.4. Métodos espectrofluorimétricos en disolución para la determinación directa de pesticidas de uso frecuente.

Pesticida	Disolvente	L.D. ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Matriz	Ref
Carbaril	Metanol/agua	170,0	Aguas	94
	Etanol	1,0	Suero	95
o-fenilfenol	Metanol	---	Frutas	97
	Metanol/Acetonitrilo	100	Frutas	96
Morestan	Acetonitrilo/agua	5,0	Formulaciones	99
	Acetonitrilo		Frutas	98
Dicuat	Agua	---	---	102
Bentazona	Dimetilformamida	3,3	Judías verdes	103
	Diclorometano	100,0	Aguas	104
Benomilo	Acetato de etilo	1,0	Aguas	100
	Diclorometano	20,0	Alimentos	101
Diclone	Dioxano	100,0	Formulaciones	105
Bifenilo	Agua	>100,0	Frutas	106
	Acetonitrilo/Metanol	500,0	Frutas	96
	Metanol	--	Frutas	97
Warfarina	Metanol	100,0	Aguas	107
	Etanol	1000,0	Suero	110
Tiabendazol	Agua/Etanol	26,2	Vegetales	108
	Acetato de etilo	Frutas	109

De esta forma la señal fluorescente emitida por el analito aumenta notablemente permitiendo así el establecimiento de métodos de mayor sensibilidad. Así se ha comprobado que el pesticida warfarina forma un complejo de inclusión con β -ciclodextrina que permite determinar el analito con un límite de detección de $0,02 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ [6] y la bentazona forma complejo con α -ciclodextrinas alcanzándose un límite de detección de $3,0 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ [7].

Métodos indirectos.

Cuando el analito no presenta fluorescencia intrínseca, podemos utilizar la fluorescencia como señal analítica si previamente lo sometemos a una transformación química que dé como resultado la aparición de un derivado fluorescente, o bien, podemos someter al analito a una reacción de derivación o marcado fluorescente, mediante la cual se le incorpora una molécula fluorescente, como es el caso del cloruro de dansilo, capaz de unirse a aminoácidos primarios y grupos fenólicos, la fluorescamina o el aldehído *o*-ftálico que reaccionan con aminas primarias, o el Cl-NBD [4-cloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol] que reacciona con aminas alifáticas tanto primarias como secundarias, por citar los marcadores fluorescentes más empleados.

Espectrofluorimetría en fase sólida.

Como se ha indicado anteriormente, en el análisis de residuos, una de las características fundamentales del método ha de ser su sensibilidad y una forma de conseguir una gran sensibilidad, además de utilizar una técnica analítica que la presente, es efectuar una preconcentración de la muestra. La espectrofluorimetría en fase sólida es una técnica analítica que aúna estas dos posibilidades, el uso de la fluorescencia y la preconcentración del analito en una pequeña cantidad de so-

porte sólido sobre la cual se efectúa la medida fluorescente. Esta técnica, estudiada por F. Capitán y col. [8-23], se basa en utilizar un volumen apropiado de muestra en disolución (el volumen puede oscilar entre 100 mL y varios litros) y agitarlo, durante un tiempo determinado, junto con los reactivos adecuados y una cantidad de sólido particulado apropiado para que el analito, o un derivado del mismo, se fije sobre ella. Posteriormente se recoge el sólido con el analito fijado sobre él y se empaqueta en una cubeta de 1 mm de paso de luz en la que se mide directamente la fluorescencia difusa transmitida por el sistema. Cuando el ángulo que forma el haz de excitación y el plano de la cubeta es de 45°, la fluorescencia medida es máxima. Mediante esta técnica se han puesto a punto métodos de determinación de especies metálicas tales como aluminio [9], berilio [10], molibdeno [16], wolframio [13] o galio [8], tras la formación de un complejo fluorescente con morina, ácido carmínico ó saliciliden-*o*-aminofenol respectivamente; aniones como bromuro con fluorescentes hidrocarburos policíclicos aromáticos (fluoreno, fluoranteno, benzo-*a*-pireno, pireno y benzo-*a*-antraceno, entre otros)[17-23] y pesticidas [tiabendazol (TBZ), carbaril (CBL), morestan (MOR), *o*-fenilfenol (OPP), benomilo (BEN), warfarina (WAR), ácido naftilacídico (ANA)...][24-31], utilizando como soportes sólidos, diferentes tipos de resinas Sephadex (G-15, QAE-A-25, DEAE C-25) o sílice C-18. Mediante estos métodos se han conseguido límites de detección muy bajos que en algunos casos, como es el del antraceno, alcanzan el valor de 21 ng·L⁻¹.

Limitándonos al caso concreto de la aplicación de la espectrofluorimetría en fase sólida a la determinación de restos de pesticidas en diferentes matrices, los resultados obtenidos se han expuesto en el capítulo denominado: Aproximación al análisis de pesticidas mediante espectrofluorimetría en fase sólida, perteneciente al libro de título: Plaguicidas, Aspectos ambientales, analíticos y toxicológicos,

[32] del que son autores L.F. Capitán y col. y de donde hemos extractado los datos que se encuentran en la tabla I.5. Como se aprecia en esta tabla, los métodos se pueden aplicar tanto a la determinación de un solo pesticida como a mezclas de ellos, obteniéndose límites de detección del orden de los $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y soslayando, en estos últimos casos, las interferencias debidas al solapamiento espectral mediante el uso de la primera derivada del espectro sincrónico.

Continuando en esta línea de investigación, cuyos objetivos son el estudio y desarrollo de nuevas metodologías analíticas que permitan la determinación de contaminantes orgánicos, en concentraciones al nivel de trazas, mediante técnicas luminiscentes y utilizando la fase sólida para efectuar la medida, nuestro grupo de trabajo se planteó la posibilidad de desarrollar nuevas metodologías analíticas en las que la selectividad, sensibilidad, facilidad y sencillez de manejo y la corta duración del análisis fueran sus principales características analíticas.

Tabla I.5. Métodos espectrofluorimétricos de fase sólida para la determinación de pesticidas.

Pesticida	Fase sólida	LD ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Matriz
OPP	S. QAE-A25	0,08	Aguas
CBL	S. QAE-A25	0,1	Aguas
MOR	C-18	0,15	Aguas
BEN	C-18	0,04	Aguas
WAR	S. QAE-A25	0,06	Aguas y suero
TBZ	S. G-15	0,1	Aguas y frutas
ANA	S. QAE-A25	0,09	Aguas
CBL/OPP	S. QAE-A25	0,2/0,1	Aguas
BEN/MOR	C-18	0,15/0,18	Aguas

Por ello se eligió la fosforescencia como técnica de medida, dada su selectividad y sensibilidad y la fase sólida como la forma más adecuada para efectuar la medida de la señal fosforescente. En una primera etapa se trataría de establecer metodologías sin preconcentración, utilizando para ello papel como soporte sólido y, en una segunda etapa se intentaría establecer una metodología, también en fase sólida, pero utilizando como soporte un sensor sobre el que, previamente a la medida de la señal analítica, se efectuaría una preconcentración del analito, intentando con ello aumentar la sensibilidad del método.

Por tanto, pasamos a exponer brevemente, los fundamentos de la espectrofosforimetría en fase sólida haciendo hincapié en la forma de realizar las medidas para ver cuáles son las variables experimentales que influyen sobre ella.

ESPECTROFOSFORIMETRÍA

La fosforescencia es un fenómeno de origen molecular consistente en la emisión de fotones, de energía $h\nu$, por parte de una población de moléculas que previamente han sido excitadas mediante la absorción de fotones de energía $h\nu_0$, siendo $h\nu_0 > h\nu$. Este fenómeno se puede utilizar como técnica analítica ya que es posible establecer una relación lineal entre el parámetro químico que se desea medir (generalmente la concentración de analito fosforescente) y la magnitud física observable macroscópicamente que normalmente será la intensidad de radiación fosforescente emitida por el analito, bajo determinadas condiciones experimentales, o sea,

$$I_F = B.C \quad (\text{Ec. I.1})$$

donde: I_F es la intensidad de fosforescencia medida por el instrumento; C es la concentración de analito fosforescente y B es una constante de proporcionalidad, que podemos obtener mediante un proceso de calibración, llevado a cabo tras la optimización de las variables experimentales que influyen en el fenómeno y cuyo valor depende, entre otras cosas, de las condiciones experimentales establecidas.

Si en cualquier otra técnica analítica la optimización de estas variables experimentales es de enorme importancia, en el caso de la espectrofotometría es, si cabe, aún mayor ya que la señal analítica puede incluso no producirse si las condiciones experimentales no son las idóneas. En consecuencia, el conocimiento de cuáles son estas variables y cómo influyen sobre la señal analítica es de enorme importancia para establecer métodos de análisis basados en esta técnica.

En el proceso de medida de la intensidad de fosforescencia (I_F) intervienen dos sistemas físicos diferentes: por una parte la muestra que produce el fenómeno de emisión y por otra el instrumento que mide la propiedad analítica, por lo tanto, existen dos tipos de variables o parámetros experimentales: los que dependen del

propio fenómeno de emisión, que están relacionados directamente con la naturaleza de la muestra y su entorno físico-químico y los que dependen del instrumento de medida. Unos y otros deberán ser estudiados con objeto de establecer las condiciones óptimas para la emisión de fosforescencia. Comenzaremos por estudiar el fundamento físico de la fosforescencia y posteriormente veremos como puede ser esta afectada por los parámetros instrumentales y del entorno físico-químico en el que se encuentra el analito en el momento de la medida.

Procesos fotoluminiscentes.

La mayoría de las especies orgánicas que presentan fotoluminiscencia son compuestos aromáticos o, en ocasiones, compuestos alifáticos insaturados con un cierto número de orbitales π , ocupados por pares electrónicos en su estado de mínima energía electrónica o estado fundamental. De acuerdo con el principio de exclusión de Pauli, los espines de estos pares electrónicos son opuestos y las moléculas en estado fundamental presentarán un espín neto nulo. Dado su comportamiento espectral en un campo magnético externo, diremos que la molécula se encuentra en un estado singlete fundamental al que denominaremos S_0 .

Como hemos esquematizado en el diagrama de la figura I.1, durante el proceso de excitación, la molécula absorbe un fotón de energía $h\nu_0$ y sufre una transición electrónica por la cual un electrón de un orbital π enlazante, o n no enlazante, pasa a un orbital antienlazante π^* , desocupado y de mayor energía que el orbital de procedencia. En este estado la molécula se encuentra excitada, sus electrones continúan apareados y su espín neto sigue siendo nulo. Dependiendo de la energía absorbida, el estado singlete excitado será el primero, segundo,... ó n -ésimo estado excitado y se denominará S_1 , S_2 , ... ó S_n respectivamente. Este proceso de absorción se produce en un tiempo que oscila alrededor de 10^{-15} s.

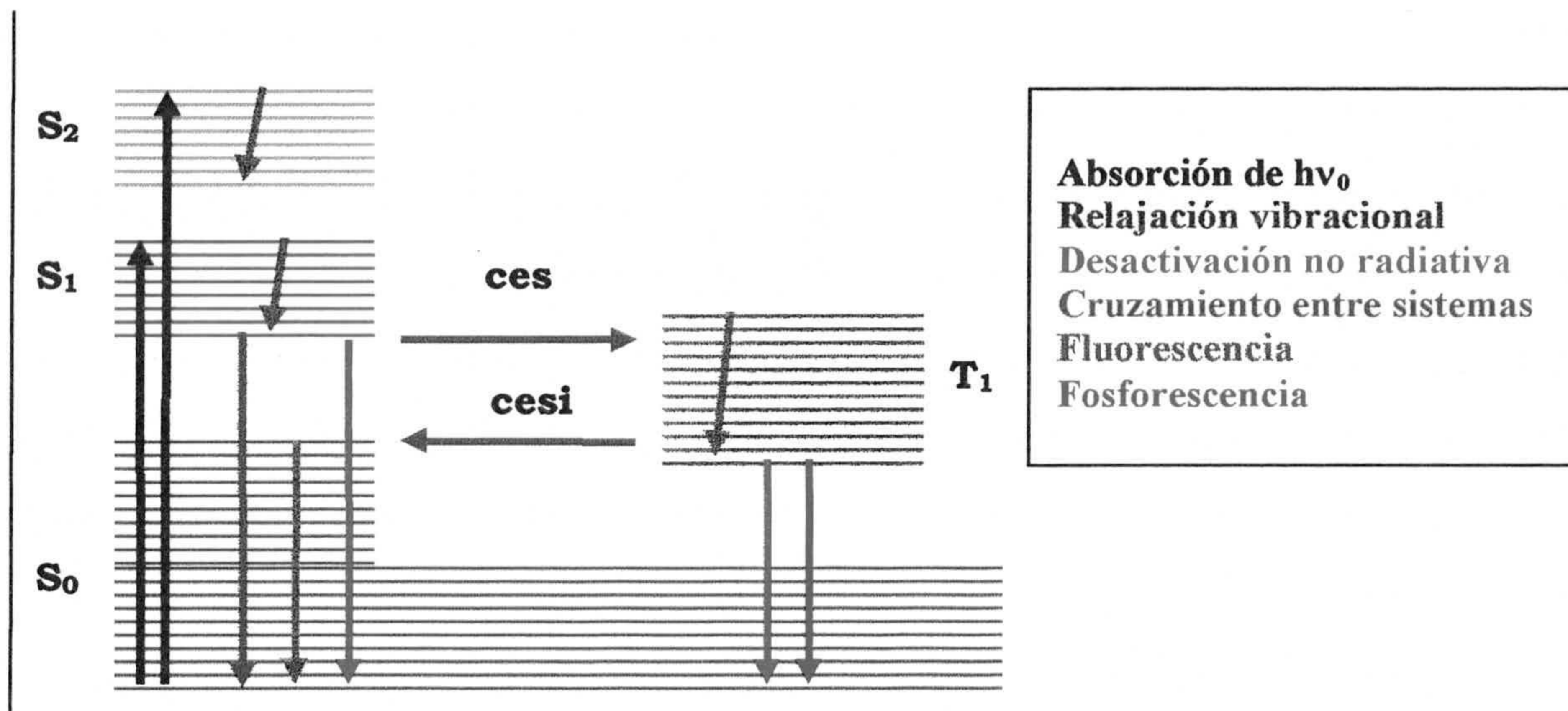


Figura I.1. Diagrama de Jablonski

Ahora bien, en cualquiera de los estados o niveles energéticos electrónicos (S_0, S_1, \dots, S_n), la molécula puede encontrarse en diferentes niveles energéticos vibracionales caracterizados por poseer una energía vibracional ($\nu_1, \nu_2, \nu_3, \dots, \nu_n$) que también está cuantizada.

Tras el proceso de excitación, generalmente, la molécula se encuentra en un alto estado vibracional dentro del estado electrónico excitado en el que se encuentre y tiende a volver al estado fundamental mediante un proceso de desactivación. Para ello el primer cambio que suele producirse es un proceso de pérdida de energía vibracional, al que llamaremos *relajación vibracional*, mediante el cual la molécula, dentro del estado electrónico en el que se encuentre (S_1, S_2, \dots, S_n), pasa desde el estado vibracional de alta energía (ν_n) al estado vibracional de menor energía ν_0 . Esta relajación vibracional, al igual que el proceso de absorción o excitación, es un proceso rápido siendo su duración del orden de 10^{-12} s. Por lo tanto tras la excitación y posterior relajación vibracional, la molécula se encontrará en

un estado energético dado por un nivel vibracional ν_0 y un nivel electrónico S_n en donde n puede ser 1, 2, 3, ...

En este momento y bajo determinadas condiciones, principalmente impuestas por la estructura molecular, puede producirse una transición consistente en el paso de la molécula desde el nivel vibracional ν_0 de un determinado estado excitado (S_n) a un nivel vibracional alto del estado excitado inmediatamente inferior (S_{n-1}). En estos procesos el nivel de llegada y el de partida son de semejante energía y no se produce cambio de espín electrónico. Al proceso se le conoce como *conversión interna* y, al igual que ocurre con el proceso de relajación vibracional, es una transformación rápida en la que tampoco se emite energía radiante.

Tras los procesos de relajación vibracional y conversión interna (este último sólo en determinadas ocasiones) la molécula se encontrará en el nivel vibracional ν_0 del estado excitado S_1 y es en este momento cuando la desactivación molecular puede transcurrir por diferentes cauces de los cuales dos de ellos implican la emisión de radiación electromagnética UV-Vis, mientras que los restantes son procesos no radiativos. Como podemos ver en la citada figura I.1, la molécula en el estado energético dado por S_1 y ν_0 puede sufrir una de las siguientes transformaciones hasta quedar desactivada:

1. *Desactivaciones no radiativas*, con transiciones $S_1 \rightarrow S_0$ debidas a conversión interna o a cualquier tipo de desactivación por interacción con otras moléculas del entorno (colisiones, formación de excímeros, etc.).
2. *Desactivación mediante emisión fluorescente*, consistente en la emisión de un fotón ($h\nu$) de menor energía que la correspondiente al fotón absorbido $h\nu_0$.
3. *Cruzamiento entre sistemas*. En este proceso se produce un paso semejante a la conversión interna pero paralelamente tiene lugar un cambio de espín electrónico con lo cual el estado que se alcanza, dado su comportamiento espectral

en un campo magnético externo, es un estado triplete al que denominaremos T_1 . La transición producida tiene lugar desde el nivel vibracional ν_0 del estado excitado S_1 hasta un nivel vibracional ν_n del estado triplete T_1 , caracterizado este último porque los espines del par electrónico implicado son paralelos entre sí. Esta transición es imprescindible para que se produzca el fenómeno de emisión fosforescente ya que, aunque el estado triplete T_1 se puede alcanzar directamente por excitación desde S_0 esta posibilidad en la práctica o no se presenta, o el número de moléculas que lo sufren es irrelevante. Desde este estado (vibracional ν_n del estado T_1) la molécula puede sufrir una relajación vibracional pasando al estado vibracional ν_0 del propio estado electrónico T_1 tras lo cual nuevamente puede seguir varios caminos para su desactivación:

4. *Cruzamiento inverso entre sistemas.* Si las condiciones experimentales son las adecuadas, la molécula puede sufrir una transición inversa a la anterior por la cual pasará desde T_1 a un nivel vibracional alto del estado fundamental S_0 , desde el que caerá hasta el nivel vibracional más bajo de dicho estado mediante un proceso de relajación vibracional. Proceso en el que no se emite radiación y cuya duración es similar a la del proceso fosforescente.
5. *Desactivación no radiativa* debida a procesos colisionales bimoleculares, formación de excímeros, etc., cuyo resultado es una desactivación de la molécula sin emisión de radiación electromagnética, en la que se pasa desde el nivel ν_0 del estado T_1 hasta S_0 .
6. *Desactivación por emisión de fosforescencia.* Desde el estado triplete excitado T_1 de menor energía vibracional ν_0 , si las condiciones son apropiadas, la molécula puede volver al estado singlete fundamental S_0 , emitiendo un fotón cuya energía sea la diferencia entre las energías correspondientes a ambos estados, dando lugar al fenómeno de *emisión fosforescente*.

En consecuencia, limitándonos al caso de la emisión de fosforescencia, para que una molécula emita un fotón de fosforescencia, tienen que concurrir las siguientes circunstancias:

1. Que la molécula sea excitada desde el estado S_0 al S_n (generalmente S_1) mediante la absorción de un fotón de energía $h\nu_0$.
2. Que sufra relajaciones vibracionales y conversiones internas hasta alcanzar el estado S_1 de menor energía vibracional.
3. Que se produzca un cruzamiento entre sistemas seguido de una relajación vibracional hasta alcanzar el estado T_1 de menor energía vibracional.
4. Que la desactivación desde T_1 hasta S_0 se produzca mediante emisión de radiación y no por cualquier otro proceso de los que hemos indicado anteriormente. Este proceso fosforescente tiene una duración comprendida entre 10^{-4} y 10^2 segundos y está en competencia con los demás procesos de desactivación.

Emisión de fosforescencia

Hasta este momento hemos resumido brevemente los posibles caminos de desactivación que puede seguir *una molécula* tras sufrir una excitación mediante absorción de un fotón, es decir, hemos estudiado el fenómeno a escala microscópica. Ahora bien, la intensidad de fosforescencia emitida por una muestra analítica no se debe al comportamiento de una única molécula, sino que es el resultado de la contribución individual de una gran población molecular ($\sim 10^{18}$), por ello, al estudiar los procesos de excitación y desactivación a escala macroscópica, hemos de tener presente que no todas las moléculas se comportarán de la misma forma, sino que siempre tendremos grupos de ellas (más o menos extensos) que optarán por cualquiera de los posibles caminos anteriormente indicados. Así, cuando es-

tamos midiendo la fosforescencia emitida por una muestra, bajo determinadas condiciones experimentales, lo que estamos obteniendo es una medida de los fotones de una determinada energía, emitidos por una fracción de las moléculas de la muestra, bajo un ángulo sólido correspondiente al área de captura del detector y por unidad de tiempo. Pero, simultáneamente a este fenómeno de emisión fosforescente, otras fracciones de moléculas estarán emitiendo fluorescencia, se desactivarán por procesos no radiativos o simplemente no habrán sido excitadas por el haz incidente. El hecho de que predomine un proceso u otro dependerá de la naturaleza de la muestra y de las condiciones en las que se encuentre durante la medida, mientras que la magnitud de la señal analítica dependerá fundamentalmente de la forma en que se efectúe la medida, de ahí la necesidad que apuntábamos anteriormente, de optimizar todas y cada una de las variables experimentales que influyen en el proceso fosforescente, para que la fracción de moléculas que emitan fosforescencia sea la máxima posible y el instrumento pueda captar su emisión en las condiciones óptimas que garanticen la calidad del método analítico.

Limitándonos al estudio de la emisión de fosforescencia, hemos de tener en cuenta que se trata de un proceso de tipo probabilístico semejante, en ciertos aspectos, a la emisión radiactiva de los elementos transuránidos. Por lo tanto es conveniente conocer el comportamiento conjunto de la población de moléculas emisoras de fosforescencia.

En los actuales espectrómetros de fosforescencia, la radiación de excitación está modulada en pulsos de corta duración ($\sim 10^{-6}$ s) que se suceden a intervalos constantes de tiempo. De esta manera el tiempo transcurrido entre el comienzo de un pulso y el comienzo del siguiente constituye lo que se denomina un ciclo y durante un ciclo el instrumento envía un pulso de excitación a la muestra y posteriormente mide la fosforescencia emitida por esta durante un intervalo de

tiempo relativamente corto. Como hemos indicado anteriormente, el fenómeno de emisión de fosforescencia no comienza hasta que transcurre un tiempo mínimo de 10^{-4} s desde que la molécula es excitada.

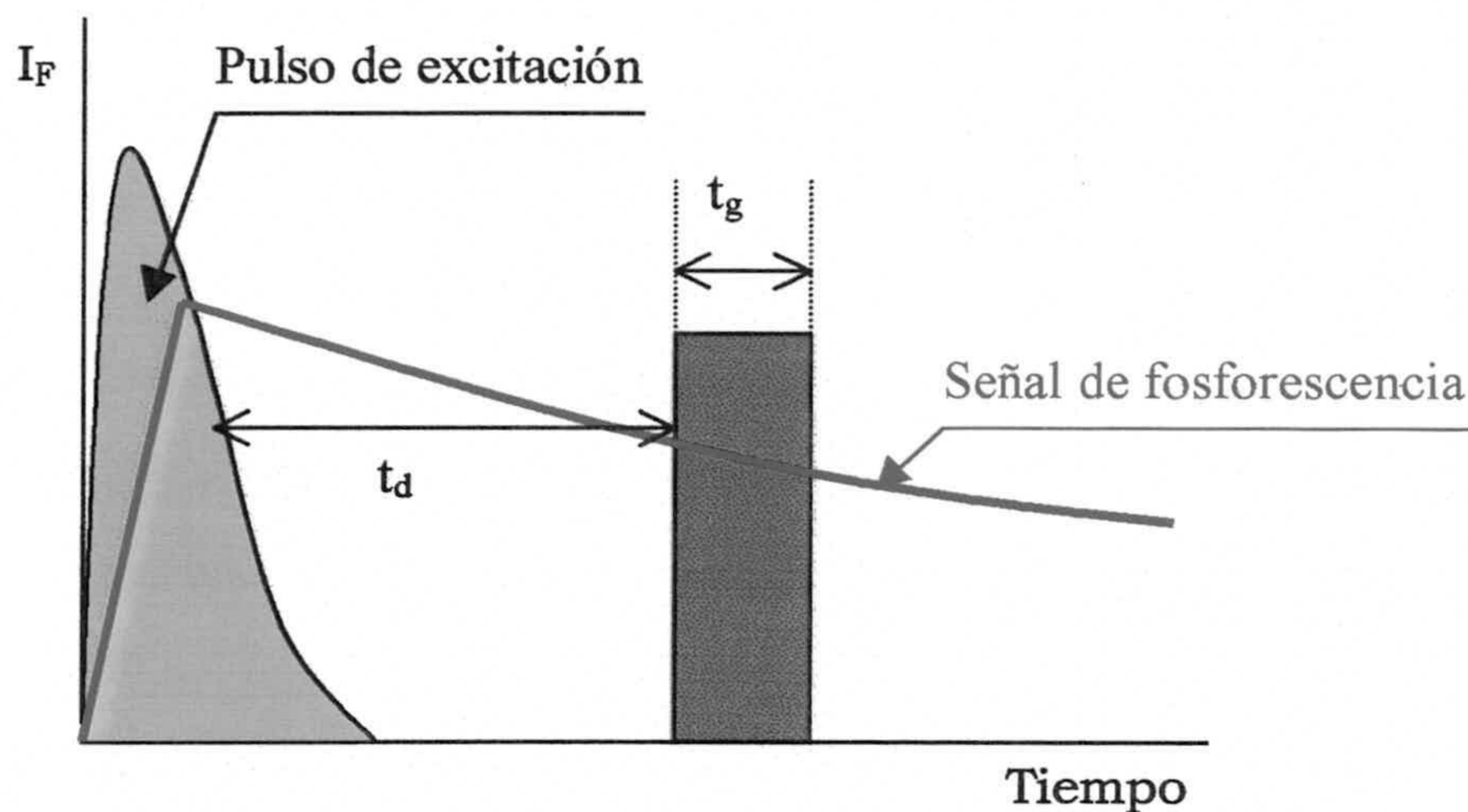


Figura I.2 Esquema de los tiempos de excitación, retraso en la lectura y apertura del detector, en un pulso de fosforescencia.

Ahora bien, tras la excitación no todas las moléculas de la muestra emiten su fotón a la vez sino que lo hacen escalonadamente de manera que la intensidad de fosforescencia emitida decae exponencialmente de la forma que podemos ver en la figura I.2. La medida de intensidad de fosforescencia emitida se puede hacer, a partir del instante en que cesa el pulso de excitación y hasta el momento en que comienza un nuevo ciclo y para ello se abre la entrada de radiación al detector durante un determinado intervalo de tiempo. El tiempo de espera transcurrido entre el cese del pulso de excitación y el comienzo de la medida se denomina tiempo de retraso de lectura (t_d) y el tiempo que el detector está midiendo se denomina tiempo de apertura del detector (t_g). Ambos tiempos puede ser seleccionados a voluntad del experimentador dentro de unos límites marcados por el diseño del propio

del propio instrumento. Estos dos parámetros instrumentales, t_d y t_g , característicos de la fosforescencia, son dos de los parámetros experimentales que más influyen en la intensidad de la señal analítica permitiendo, además, incrementar la selectividad de esta técnica mediante un uso adecuado de los mismos.

Por otra parte, hemos de tener en cuenta que la caída exponencial de la fosforescencia emitida no es la misma para todas las especies fosforescentes ya que, dependiendo fundamentalmente de la naturaleza de la molécula, la emisión fosforescente puede decaer de forma más o menos rápida. Para cuantificar esta mayor o menor duración de la emisión fosforescente se define el *tiempo de vida media de la fosforescencia* (τ_F) como el tiempo requerido para que, bajo unas condiciones dadas, la intensidad de fosforescencia disminuya hasta un valor $1/e$ de su valor inicial, o sea,

$$\frac{I_F(t)}{I_F(0)} = e^{-t/\tau_F} \quad (\text{Ec I.2})$$

en donde $I_F(0)$ y $I_F(t)$ son, respectivamente, las intensidades de fosforescencia inicial y al cabo de un tiempo t , e es la base de logaritmos neperianos y τ_F el tiempo de vida media de la fosforescencia. Como podemos apreciar, si $t = \tau_F$ el cociente $I_F(t)/I_F(0)$ valdrá $1/e$ como se deduce de la definición de tiempo de vida media que anteriormente hemos expuesto.

Hasta ahora hemos resumido brevemente el origen molecular de la fosforescencia y cuales son algunas de las variables intrínsecas al fenómeno que derivan directamente de la forma de medida. Pero además de estas variables existen otras, debidas tanto al instrumento como a la propia muestra, que también influyen decisivamente en la intensidad de fosforescencia medida. Comenzaremos por ver los parámetros instrumentales y posteriormente estudiaremos los que afectan a la muestra.

Factores instrumentales. Como podemos apreciar en el esquema de la figura I.3, de la intensidad total de radiación producida por la fuente (I_{0i}) sólo una fracción monocromática de ella pasa por la rendija de salida (R_2) del monocromador de excitación e incide sobre la superficie de la muestra que contiene al analito fosforescente, representada por Z en la citada figura. Esta fracción viene dada por la expresión $I_{0i}k_0$, en donde k_0 es un parámetro que engloba los siguientes factores: ángulo sólido bajo el cual llega radiación a la rendija de entrada (R_1) del monocromador de excitación, dispersión recíproca lineal, transmitancia y sección de la rendija de salida del mismo (R_2). De esta forma podemos decir que la radiación que incide sobre la muestra es de una intensidad $I_{0i}k_0$. Una parte de esta radiación incidente puede ser reflejada, otra será absorbida por una fracción de las moléculas de la especie fosforescente que se encuentran en el espacio barrido por el haz incidente produciendo la excitación de esta fracción de moléculas, mientras que otra fracción de la misma será absorbida por especies químicas, distintas del analito, presentes en la muestra y el resto emergerá de la superficie posterior de la muestra sin que sea absorbida.

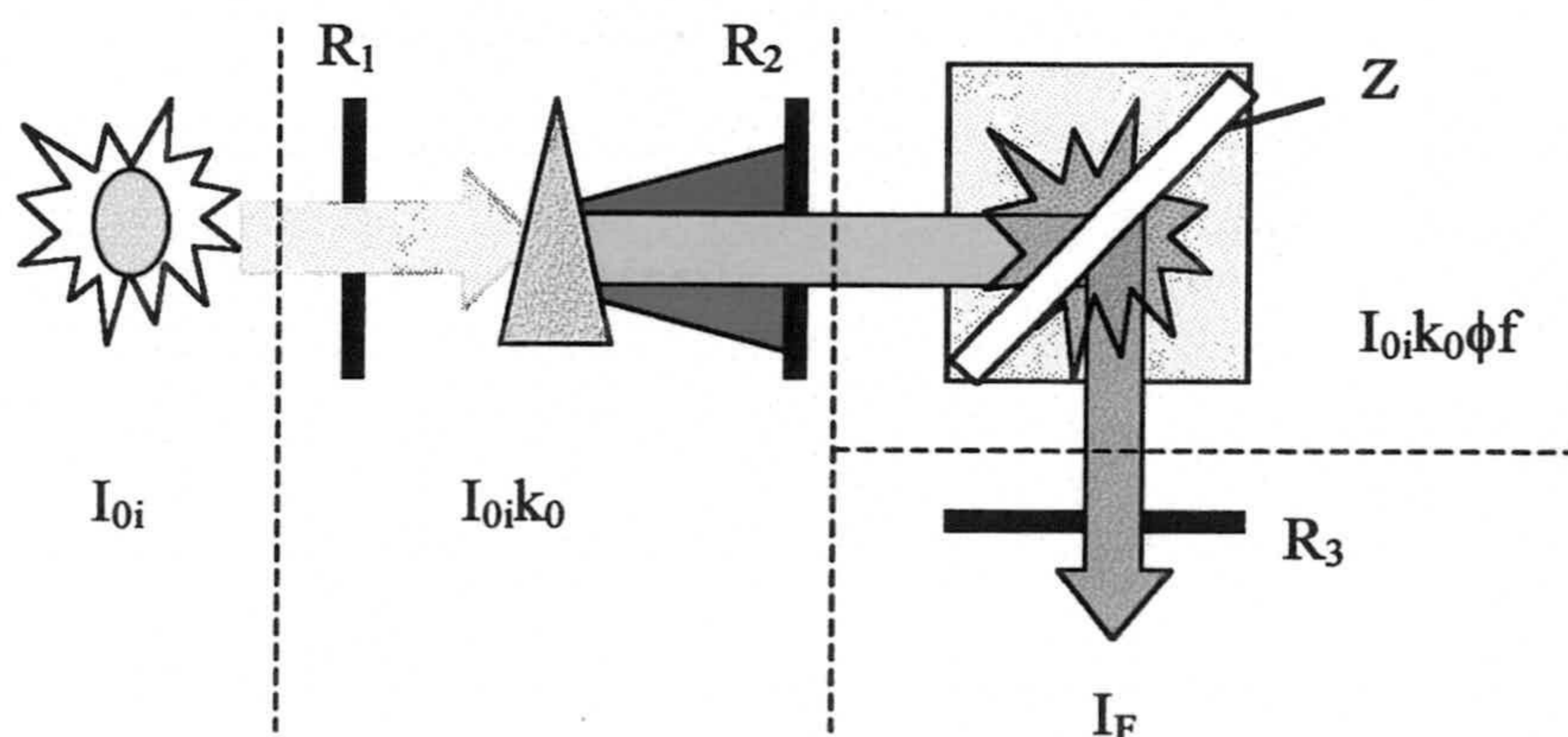


Figura I.3 Esquema del proceso de medida de fosforescencia

La fracción de radiación absorbida por las moléculas de analito será la encargada de producir su excitación y parte de las moléculas que absorben radiación darán lugar a emisión de fosforescencia, ya que la población de moléculas que emiten fosforescencia depende del valor de la fracción de moléculas que alcanzan el estado T_1 y del valor de la fracción de estas que se desactivan por fosforescencia y no por cualquier otro proceso no radiativo. Para establecer el valor de esta fracción de moléculas que emite fosforescencia vamos a definir el rendimiento cuántico de fosforescencia (ϕ_F) como el cociente:

$$\phi_F = \frac{NF_F}{NF_A} \quad (\text{Ec. I.3})$$

donde: ϕ_F es el rendimiento cuántico de fosforescencia, NF_F es el número de fotones emitidos como fosforescencia y NF_A el número de fotones absorbidos por las moléculas del analito. Este rendimiento cuántico o eficiencia cuántica de fosforescencia es un parámetro molecular, intrínseco al fosforóforo para unas condiciones experimentales dadas. Más adelante veremos cuáles son los factores o variables que influyen en este rendimiento cuántico.

Ahora bien, cuando se trata de fosforescencia en fase sólida, como es nuestro caso, la fracción de moléculas que absorben un fotón y que posteriormente producen fosforescencia depende del rendimiento cuántico de fosforescencia y de las propiedades ópticas del medio sólido en el que se encuentra incluido el analito [34]. En esta Memoria se han utilizado dos tipos de soportes sólidos: a) papeles, que se consideran como medios ópticamente heterogéneos y no transparentes y b) sensores planos, que pueden ser considerados como medios homogéneos y transparentes.

Medios homogéneos. En el caso de medios homogéneos, como es el caso de los sensores aquí estudiados, formados por una fina película de material trans-

parente (PVC) depositado sobre un soporte sólido también transparente a la radiación que vamos a utilizar y medir, si se dan las condiciones apropiadas, se cumple la ley de Beer, de manera que la intensidad de radiación absorbida por las moléculas de analito en la muestra vendrá dada por la expresión:

$$I_a = I_0 (1 - e^{-2,303\epsilon bC}) \quad (\text{Ec. I.4})$$

donde, $I_0 = I_{0i}k_0$ es la intensidad de radiación monocromática que incide sobre la muestra y I_a es la intensidad absorbida por el analito de la muestra. C es la concentración de analito, ϵ el coeficiente de absorptividad molar y b el espesor de la muestra. Desarrollando en serie el término encerrado entre paréntesis y quedándonos sólo con el primer término del desarrollo, la anterior ecuación nos queda como sigue:

$$I_a = 2,303 I_0 \epsilon b C \quad (\text{Ec. I.5})$$

en donde podemos ver que la fracción de radiación monocromática absorbida por la muestra es proporcional a la concentración de analito en la misma. Esta aproximación, consistente en desprestigiar los términos superiores del desarrollo en serie, se puede admitir porque el producto $\epsilon b C$ es del orden de 10^{-2} y el error cometido, en el caso más desfavorable, al desprestigiar los términos superiores sería del orden del 2%.

La intensidad de fosforescencia total emitida por la muestra en todas direcciones será entonces:

$$I_{Ft} = \phi_F I_a = 2,303 \phi_F I_0 \epsilon b C \quad (\text{Ec. 1.6})$$

donde se ha introducido el rendimiento cuántico de fosforescencia para relacionar la radiación absorbida y la que se emite como fosforescencia. Ahora bien, de toda esta emisión fosforescente sólo una fracción de ella atraviesa la rendija de entrada al monocromador de emisión (R_3) y posteriormente sólo una fracción monocromática de esta alcanza el detector y produce un valor de intensidad de fosfores-

cencia I_F que será la señal analítica realmente medida por el instrumento. El valor de esta fracción, depende de una serie de factores tales como: rendimiento del detector para la longitud de onda medida, dispersión del monocromador de emisión, transmitancia del mismo, procesos de autoabsorción o de absorción de fosforescencia por parte del soporte sólido o de cualquier otra especie presente en la muestra, sección de la rendija de emisión, etc. y, por tratarse de una muestra sólida de una geometría determinada, también dependerá de los ángulos que forma el plano de la muestra con los haces de excitación y emisión como vamos a tratar de justificar seguidamente.

En efecto, como podemos apreciar en el esquema de la figura 1.4, aunque los haces de excitación y emisión medida forman un ángulo de 90° por razones de diseño del instrumento, al variar el ángulo de incidencia del haz de excitación α_0 mediante un giro de la muestra alrededor de su propio eje de simetría longitudinal, varía simultáneamente el ángulo α_1 que forman el plano de la muestra y el haz de

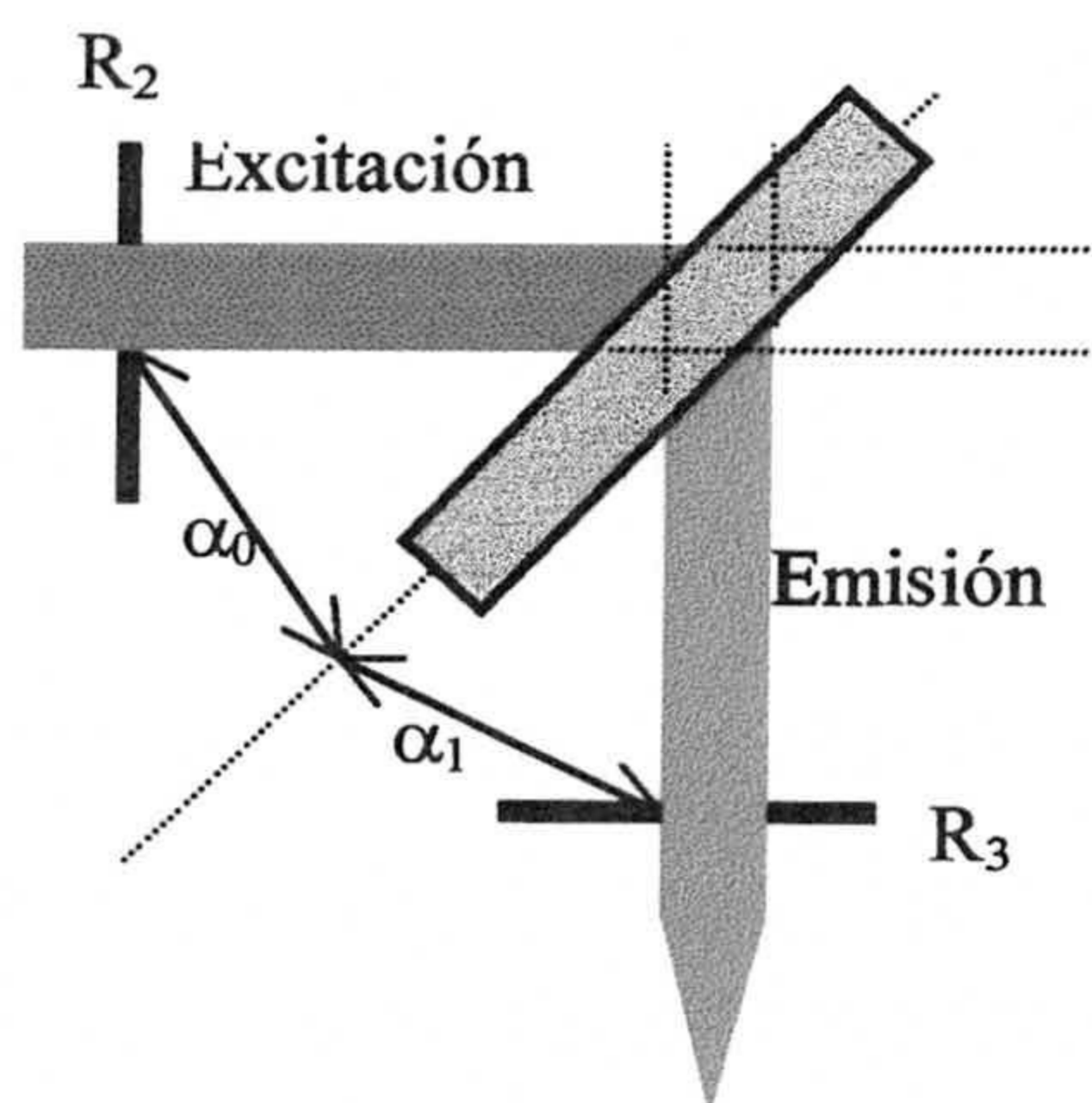


Figura 1.4 Influencia del ángulo de medida

emisión que atraviesa la rendija R_3 . Una variación de este tipo implica que el volumen de muestra barrido por el haz de excitación es mayor o menor dependiendo de α_0 , lo que se traduce en una mayor o menor intensidad de fosforescencia. Para estudiar la influencia del valor de este ángulo sobre la intensidad de fosforescencia emitida, basándonos en el esquema de la figura 1.4, llamaremos α_0 y α_1 a los ángulos que forma el plano de la

muestra con los haces de excitación y emisión respectivamente, S_0 y S_1 son las

secciones transversales de ambos haces y S_{exc} y S_{em} son las áreas que estos haces determinan sobre las caras del rectángulo que representa a la muestra. Si suponemos que la intensidad de fosforescencia que atraviesa la rendija R_3 es proporcional al número de moléculas de analito contenidas en los volúmenes de muestra barridos por los haces de excitación y emisión, V_{exc} y V_{em} respectivamente, y expresamos ambos volúmenes en función de las secciones S_0 y S_1 nos queda:

$$V_t = V_{exc} + V_{em} = \frac{S_0 b}{\text{sen } \alpha_0} + \frac{S_1 b}{\text{sen } \alpha_1}$$

llamando L a la longitud de las rendijas y r_{exc} y r_{em} a sus respectivas anchuras podemos escribir: $S_0 = Lr_{exc}$ y $S_1 = Lr_{em}$ y sustituyendo en la expresión anterior nos queda:

$$V_t = \frac{Lr_{exc} b}{\text{sen } \alpha_0} + \frac{Lr_{em} b}{\text{sen } \alpha_1} = Lb \left(\frac{r_{exc}}{\text{sen } \alpha_0} + \frac{r_{em}}{\text{sen } \alpha_1} \right) \quad (\text{Ec. I.7})$$

teniendo en cuenta que $\alpha_0 + \alpha_1 = \pi/2$ podemos escribir:

$$V_t = bL \left(\frac{r_{exc}}{\text{sen } \alpha_0} + \frac{r_{em}}{\text{cos } \alpha_0} \right) \quad (\text{Ec. I.8})$$

Admitiendo que la intensidad de fosforescencia emitida es proporcional al volumen V_t , manteniendo constantes las demás variables que influyen en el fenómeno, dicha intensidad de fosforescencia será máxima cuando lo sea el volumen V_t . Aplicando la condición de máximo (o mínimo), V_t será máximo cuando su primera derivada respecto de α_0 sea nula. Por tanto, derivando, agrupando términos y despejando α_0 , nos queda:

$$\alpha_0 = \text{arctg} \sqrt[3]{\frac{r_{exc}}{r_{em}}} \quad (\text{Ec. I.9})$$

Ecuación que nos indica que el ángulo óptimo entre el plano de la muestra y el haz de excitación depende de los valores de la anchura de las rendijas de excitación y emisión. Por ejemplo, si ambas rendijas son de la misma anchura $r_{exc} = r_{em}$, el valor óptimo de α_0 ($= \alpha_1$) será 45° , mientras que si $r_{em} = 10$ nm y $r_{exc} = 5$ nm, el valor óptimo de α_0 será $38^\circ 26' 20''$ y $\alpha_1 = 51^\circ 33' 39''$.

En consecuencia, si los ángulos α_0 y α_1 están optimizados de acuerdo con el ancho de las rendijas, la intensidad de radiación fosforescente que mide el detector estará dada por la expresión:

$$I_F = f\phi_F I_a = 2,303f\phi_F I_0 \epsilon b C \quad (\text{Ec. I.10})$$

en donde f es un factor que reúne todos los factores geométricos instrumentales a que hemos aludido con anterioridad incluidos los ángulos α_0 y α_1 .

Medios heterogéneos. En medios ópticamente heterogéneos, en nuestro caso cuando usamos los papeles como soporte sólido para la muestra, el tratamiento teórico para conocer la radiación absorbida y la posterior intensidad de fosforescencia emitida, implica la adopción de un modelo de medio sólido que permita hacer una estimación aproximada de los factores que influyen en el fenómeno fosforescente. Existen dos modelos teóricos: el modelo continuo y el modelo estadístico. Aquí, por razones de sencillez hemos adoptado el primero de ellos.

En medios ópticamente heterogéneos tanto la radiación de excitación que incide sobre la superficie del medio, como la fosforescencia producida sufren fenómenos de dispersión que impiden el cumplimiento de la ley de Beer. En estos casos, el cálculo teórico de la intensidad de fosforescencia puede hacerse mediante las expresiones de Zweidinger y Winefordner [35] derivadas, a partir de las ecuaciones de Kubelka-Munk, para medios heterogéneos y no transparentes. La expresión generalizada de la intensidad de fosforescencia total emitida viene entonces dada por la ecuación:

$$I_{Ft}^* = \phi_F I_0 (1-T-R) \quad (\text{Ec. I.11})$$

donde T representa la fracción de radiación transmitida y R la reflejada. Sustituyendo los valores de T y R e imponiendo las condiciones de límite nos queda:

$$I_{Ft}^* = 2\phi_F \beta I_0 \left[\frac{(1+\beta)\exp(\alpha\bar{b}) + (1-\beta)\exp(-\alpha\bar{b}) - 2}{(1+\beta)^2 \exp(\alpha\bar{b}) - (1-\beta)^2 \exp(-\alpha\bar{b})} \right] \quad (\text{Ec. I.12})$$

donde: \bar{b} es el espesor medio de la muestra en reflectancia difusa, S es el coeficiente de dispersión del medio sólido por unidad de espesor, $\alpha = \sqrt{K(K+2S)}$ y

$$\beta = \sqrt{\frac{K}{K+2S}} \quad \text{siendo } K = 2,303\varepsilon C.$$

En el caso de análisis mediante fosforescencia en fase sólida, teniendo en cuenta que la concentración de analito en la muestra es baja y, por tanto, $\alpha\bar{b} \ll 1$, la ecuación I.12 nos queda de la forma siguiente:

$$I_{Ft}^* = 2\phi_F I_0 \frac{2.303\varepsilon\bar{b}}{1+2S\bar{b}} C \quad (\text{Ec. I.13})$$

Como podemos apreciar al comparar las ecuaciones I.13 y I.6, en el caso de medios heterogéneos y no transparentes, la intensidad total de fosforescencia emitida por el analito en todas direcciones (I^*) es:

$$I_{Ft}^* = \frac{2I_{Ft}}{1+2S\bar{b}}$$

o sea, admitiendo que en este caso el espesor medio equivale al espesor de la muestra en los medios homogéneos, la intensidad I_{Ft}^* depende de los mismos parámetros de los que dependía la intensidad de fosforescencia total para medios transparentes y homogéneos y del coeficiente de dispersión del medio por unidad de espesor, como era de esperar.

En consecuencia, la intensidad de radiación fosforescente que mide el detector estará dada por la expresión:

$$I_F^* = 4,606f\phi_F I_0 \frac{\epsilon \bar{b}}{1 + 2S\bar{b}} C \quad (\text{Ec. I.14})$$

en donde el factor f tiene el mismo valor y significado que se le asignó en la ecuación I.6.

Comparando las ecuaciones I.10 e I.14 con la ecuación I.1 podemos comprobar que el parámetro B de la ecuación I.1 engloba todos los parámetros y variables instrumentales y de la muestra que contemplan las ecuaciones I.10 e I.14, con excepción de la concentración en ambos casos. Obviamente el valor de B en un proceso concreto de calibración, debe ser constante lo que implica dos cosas: 1º) la optimización de todos y cada uno de los parámetros enumerados con objeto de que la sensibilidad del método sea la máxima posible y 2º) que una vez obtenido el valor de B mediante una calibración adecuada, las medidas de las muestras problema han de efectuarse en las mismas condiciones experimentales utilizadas en el proceso de obtención de la función de calibración.

Factores que dependen de la muestra. Nos queda finalmente estudiar cuales son los factores intrínsecos a la muestra y su entorno físico-químico que influyen sobre la intensidad de fosforescencia que esta emite. Dentro de este grupo de factores o parámetros vamos a efectuar una nueva división: en primer lugar podemos considerar los factores que influyen en el proceso de absorción de radiación y en segundo lugar consideraremos aquellos otros que afectan al proceso de emisión fosforescente. Los primeros son los mismos que afectan a cualquier proceso de absorción molecular ultravioleta-visible entre los que cabe destacar el valor de la absorptividad molar del analito (ϵ) condicionada principalmente por la naturaleza y estructura de la molécula de este. En el segundo grupo, donde se engloban los factores que afectan al proceso de emisión fosforescente, nos encontramos con

factores que dependen de la naturaleza y estructura de la molécula del analito y con factores que dependen del proceso de preparación de la muestra y del entorno en el que esta se encuentra en el momento de efectuar la medida fosforescente.

Las condiciones estructurales de la molécula de analito que favorecen los procesos de radiación fotoluminiscente en general y fosforescente en particular, son fundamentalmente las siguientes:

1. Presencia de anillos aromáticos que permitan transiciones de baja energía $\pi \leftrightarrow \pi^*$ o $n \leftrightarrow \pi^*$.
2. Rigidez estructural que impida el libre giro alrededor de enlaces y la consiguiente desactivación no radiativa de la molécula.
3. Planaridad de la molécula para favorecer la deslocalización de los enlaces π .

Estas condiciones estructurales influirán en la capacidad de absorción de radiación a la que anteriormente hemos hecho mención y, en lo que es más significativo en nuestro caso, la predisposición de la molécula para no desactivarse rápidamente mediante conversión interna.

Por otra parte las condiciones del entorno químico que pueden influir en la fotoluminiscencia son:

1. Temperatura de la muestra. Un aumento de temperatura perjudica las emisiones fotoluminiscentes en general ya que aumenta el número de colisiones bimoleculares desactivadoras de las moléculas. En el caso de fosforescencia en fase sólida este factor es de menor importancia.
2. pH del medio sobre todo cuando la molécula posee grupos sustituyentes de carácter ácido o básico.
3. Presencia de oxígeno y/o humedad, factor este de gran importancia en el caso de fosforescencia.

4. Presencia de átomos pesados junto al analito que, por lo general, potencian el proceso fosforescente, en detrimento del fluorescente, debido al acoplamiento espín-orbital favorecedor de la transición $S_1 \rightarrow T_1$.
5. Naturaleza del disolvente en el caso de muestras en disolución.

Las condiciones estructurales de la molécula vienen impuestas por el propio analito y en ellas no podemos influir externamente para modificar la intensidad de la emisión fosforescente, cosa que no ocurre con las condiciones del entorno en el que se encuentra la molécula, sobre las que sí podemos actuar para favorecer un proceso u otro. Por este motivo vamos a estudiar la influencia que es-

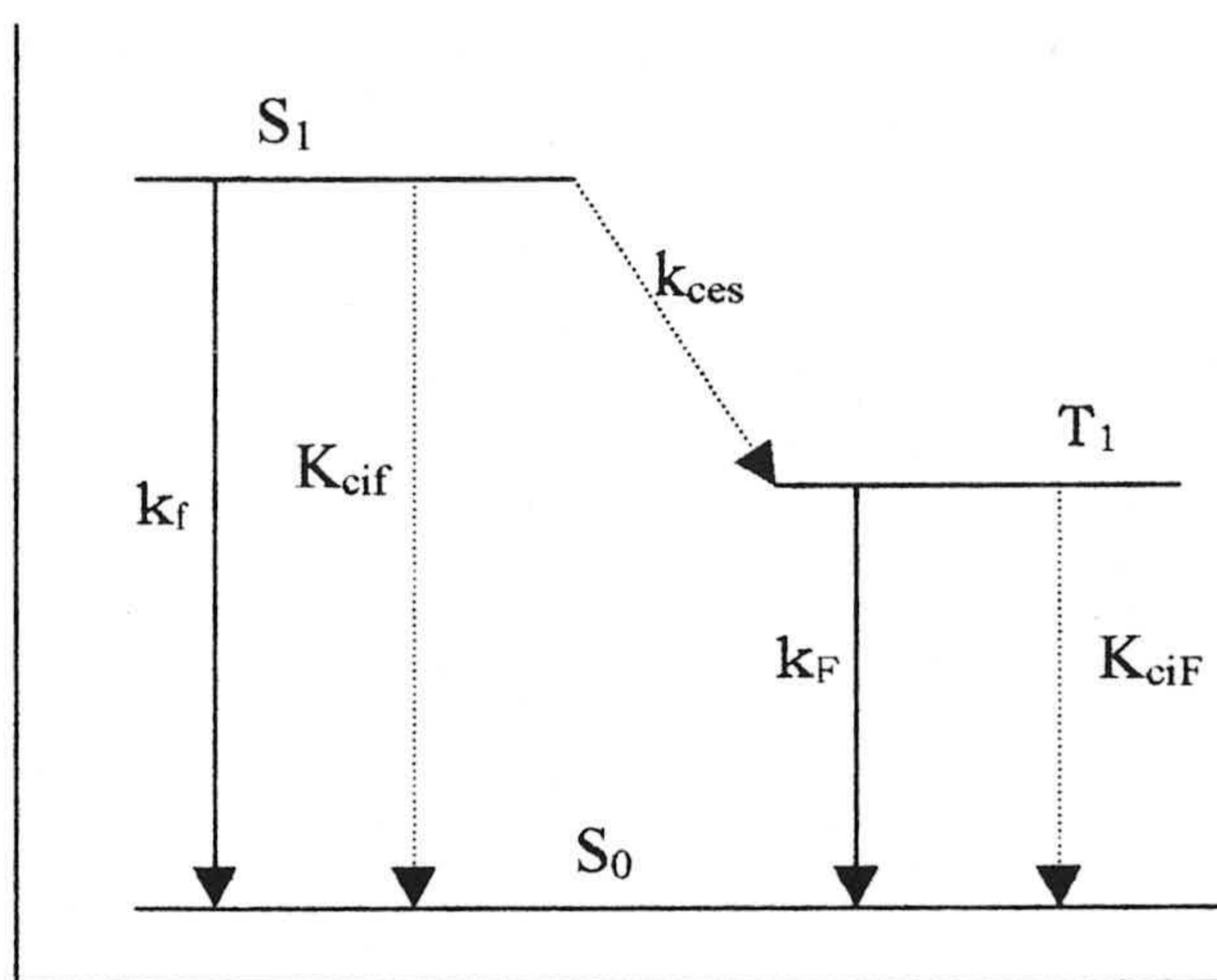


Figura I.5 Procesos que compiten con la fosforescencia

tos factores ejercen sobre el rendimiento cuántico de fosforescencia.

Como se desprende del esquema de la figura I.5, que no es más que un diagrama de Jablonski simplificado para el proceso de emisión fosforescente, el rendimiento cuántico de fosforescencia depende de varios factores: rendimiento cuántico de formación del esta-

do triplete a partir del estado singlete excitado y de las constantes de velocidad de los procesos que compiten con el proceso fosforescente, una vez que la molécula se encuentra en el estado triplete, o sea:

$$\phi_F = \frac{k_{ces}}{k_{ces} + k_f + k_{cif}} \frac{k_F}{k_F + k_{ciF} + \sum_A k_A [A]} \quad (\text{Ec. I.15})$$

donde: k_F es la constante de velocidad del proceso de fosforescencia, k_f es la del proceso de fluorescencia, k_{cif} y k_{ciF} son respectivamente las constantes de desactivación unimolecular de fluorescencia y fosforescencia por conversión interna, k_{ces} es la constante del proceso de cruzamiento entre sistemas para la formación del estado triplete desde el estado singlete excitado y k_A son las constantes de los distintos procesos de desactivación por choques (*quenching*) producidos por especies atenuadoras presentes en la muestra, procesos que pueden competir con el proceso de emisión fosforescente cuando la molécula se encuentra en el estado triplete. Las constantes k_f y k_F así como k_{ces} dependen fundamentalmente de la estructura molecular pero pueden estar afectadas por el entorno [36]. Por su parte, k_{cif} y k_{ciF} son constantes muy dependientes del entorno y, en parte, de la naturaleza de los estados electrónicos de la molécula, pero las diferentes k_A dependerán exclusivamente de la presencia de desactivantes y de las condiciones del entorno molecular tales como temperatura, naturaleza de los desactivantes, estado de agregación de la muestra (fase sólida o disolución), propiedades físicas de la misma (viscosidad), presencia de ciclodextrinas, micelas, etc. Así cada una de las constantes k_A la podemos expresar de la forma siguiente:

$$k_A = c \frac{T}{\eta} \quad (\text{Ec.I.16})$$

en donde T es la temperatura absoluta y η es la viscosidad del medio en el que se encuentran las moléculas de la sustancia fosforescente, siendo c una constante dependiente de, entre otras cosas, de la naturaleza de la sustancia atenuante.

Un estudio de la ecuación anterior nos permite llegar a las siguientes conclusiones: para obtener un alto rendimiento cuántico de fosforescencia y, consecuentemente, una alta intensidad de emisión fosforescente, para una molécula dada en la que los valores de las constantes k_F y k_{ci} estarán determinados, se puede

favorecer el paso de las moléculas excitadas desde el estado singlete al triplete actuando externamente sobre el valor de los términos encerrados en la sumatoria $\Sigma[A]cT/\eta$, es decir, la fosforescencia se verá incrementada disminuyendo en lo posible las concentraciones de las especies atenuantes, disminuyendo la temperatura o aumentando la viscosidad de la muestra, factor este último que queda incrementado al máximo cuando la muestra se encuentra en fase sólida.

Fosforescencia a temperatura ambiente sobre substrato sólido

La utilización de substratos sólidos para la observación de fosforescencia a temperatura ambiente ha despertado el interés de la comunidad científica en los últimos años. Interés por esta técnica que radica en sus especiales características para el análisis de trazas de contaminantes orgánicos. Estas características son: gran sensibilidad, gran selectividad y linealidad de respuesta. Aunque en principio, la fosforescencia puede ser observada en gases, líquidos o sólidos, en la práctica, las condiciones experimentales necesarias para la observación de emisión radiante hace que sea difícil el uso tanto de gases como de líquidos, aunque recientemente ha habido notables avances en las técnicas experimentales en ese sentido [37].

A temperatura ambiente, la molécula en estado triplete de larga vida debe ser mantenida rígidamente para minimizar los procesos no radiantes y debe también estar protegida de los efectos de la atenuación debida al oxígeno. Los requerimientos necesarios de presiones bajas y presencia de gases inertes en estos medios gaseosos hace a la fosforimetría para gases casi inviable desde un punto de vista analítico. La observación de fosforescencia en líquidos también es complicada, ya que el *quenching* colisional intermolecular contribuye a debilitar o anular la fosforescencia y además porque las disoluciones deben ser completamente deso-

xigenadas. La reciente utilización de micelas, o sensibilizadores, ha hecho que la fosforescencia en disolución sea analíticamente útil. Sin embargo, para obtener señales realmente útiles, las disoluciones micelares deben ser totalmente desoxigenadas y el analito debe presentar una solubilidad apreciable en el entorno micelar [38].

La fosforescencia fue observada en matrices sólidas por medio de una inmovilización de la sustancia fosforescente (fosforóforo) en una matriz congelada, a la temperatura del nitrógeno líquido. La necesidad de un equipo criogénico, el problema relacionado con la introducción de la muestra y los efectos de la matriz (resquebrajamientos, efectos fotoquímicos, falta de uniformidad en el microambiente), hacen que sea una técnica poco aceptada. En cambio, ha atraído gran interés la observación de fosforescencia a temperatura ambiente a partir de compuestos depositados en una superficie sólida.

Existe una aceptable variedad de materiales que han sido evaluados como sustratos [39]. A temperatura ambiente, la fosforescencia ha sido observada desde compuestos adsorbidos sobre papel de filtro, gel de sílice, óxido de aluminio, acetato sódico, sacarosa, almidón, mezclas de sales poliméricas, yeso y otros materiales. Los sustratos más comúnmente usados son los papeles de filtro. Muchos compuestos han sido estudiados usando diferentes papeles de filtro y continúan estudiándose las aplicaciones y limitaciones del soporte celulósico. En la bibliografía [40-43] se encuentran recogidos diferentes estudios que contienen información sobre los diferentes sustratos sólidos usados en fosforimetría a temperatura ambiente.

Interacciones entre el fósfororóforo y el sustrato. A partir de los artículos iniciales de Schulman y Walling [44] sobre fosforimetría a temperatura ambiente en

substratos sólidos, se han publicado muchos estudios teóricos y prácticos sobre fosforescencia de diferentes compuestos orgánicos depositados en una variada gama de soportes. Las propiedades fosforescentes del analito varían con las condiciones experimentales, esto es, con el tipo de substrato, orden de adición, pH, presencia de átomos pesados y las características estructurales de las propias moléculas fosforescentes (polaridad, carga, presencia heteroátomos).

La comprensión del proceso fosforescente y de los mecanismos de las interacciones que ocurren bajo diferentes condiciones experimentales, debería llevar al desarrollo de un substrato óptimo y, por tanto, a un modelo analítico que facilitara la selección del substrato adecuado para un fosforóforo dado [45].

Han sido propuestos varios mecanismos de interacción. Aunque inicialmente se resaltó la importancia del estado de adsorción [44], muy pronto se descubrió que las interacciones eran más fuertes cuando tenían lugar en un estado fiadsorbido. Se cree que el enlace de hidrógeno es uno de los mecanismos predominantes en la interacción presente en la superficie del substrato, como fue defendido en diversos estudios realizados sobre diversos tipos de superficies [43, 46, 47].

Wellons y cols. [48] hicieron énfasis sobre la importancia de la existencia de carga en el analito en la producción de fosforescencia. La principal interacción entre un analito iónico y el soporte se atribuye al enlace de hidrógeno entre los grupos funcionales ionizados y los grupos hidroxilo del soporte. Las mayores intensidades fueron obtenidas con compuestos de carga doble cuando fueron aplicados en presencia de hidróxido sódico 1 M, mientras que las especies neutras o con una carga mostraban una emisión muy débil. Ford y Hurtubise [49] observaron que los compuestos que tienen tendencia a enlazarse fuertemente mediante enlace de hidrógeno en cromatoplacas de silicagel muestran una fosforescencia más in-

tensa que compuestos similares que tienen grupos funcionales de polaridad inferior y que por tanto, presentan menor posibilidad de formar enlaces de hidrógeno.

La ruptura de los enlaces de hidrógeno formados en la superficie del soporte ha sido formulada [50] como la causa más probable en la atenuación observada por la humedad. Las moléculas de agua son capaces de formar enlaces de hidrógeno con las posiciones activas de la superficie del substrato y competir con el analito por estos mismos emplazamientos. En consecuencia, las interacciones del soporte-analito disminuyen, aumentando la probabilidad de desactivación no radiante y decreciendo así la emisión fosforescente [51]. El agua puede, incluso, romper los enlaces de hidrógeno entre las fibras de celulosa. Esto disminuye la rigidez de la matriz permitiendo una desactivación colisional normal al operar y transportar el oxígeno hacia las proximidades del fosforóforo.

Los efectos de la matriz, que pueden involucrar o no enlaces de hidrógeno, parecen jugar un importante papel en los procesos fosforescentes propusieron un mecanismo de aislamiento de la matriz para inducción de fosforimetría a temperatura ambiente en superficies sólidas. Se basa en el hecho de que las fibras de celulosa sufren un engrosamiento considerable ante la presencia de disolventes fuertemente polares, como pueden ser el agua y alcoholes. Este hinchamiento podría permitir la penetración del fosforóforo en las zonas submicroscópicas. Durante el proceso de secado, las fibras pierden las moléculas extra de agua, colapsan y atrapan al fosforóforo entre sus enlaces.

Evaluación de la celulosa como soporte. Los filtros de celulosa y los papeles cromatográficos son los substratos más comúnmente utilizados, como se evidencia por las numerosas publicaciones de aspectos fundamentales de la fosforimetría a temperatura ambiente en este tipo de soportes. Son simples y aconsejables para

usar, económicos, fácilmente disponibles y muy efectivos en la inducción de fosforescencia para una amplia variedad de muestras [35, 46, 52]. La gran variedad de papeles de filtro disponibles, con diferentes características químicas y físicas en su superficie, los hace especialmente atractivos para el estudio de distintos tipos de fosforóforos.

Desgraciadamente, hay diversos inconvenientes asociados a su uso en fosforimetría a temperatura ambiente. El papel de filtro celulósico, como todos los restantes substratos que se han utilizado, presenta fosforescencia de fondo (aparece una banda ancha entre 400 y 600 nm). Para un gran número de sustancias orgánicas que emiten en esta región espectral, los límites de detección aumentan dependiendo de la magnitud de la señal de fondo. La fosforescencia de fondo también es una fuente de interferencias espectrales de los fosforóforos débiles. Ha sido atribuida a las impurezas presentes en los residuos hemicelulósicos y a las de la propia fibra celulósica [54].

Bateh y Winefordner [54] han publicado un estudio evaluando a la celulosa como substrato para fosforimetría a temperatura ambiente. Trataron de eliminar las trazas de metales de transición que podían contribuir a la fosforescencia de fondo utilizando el ácido dietilentiáminopentacético en papel de filtro S&S 903. El tratamiento no produjo el efecto deseado pero se observó un considerable aumento de la señal del analito en comparación con los papeles no tratados.

Otros trabajos han tratado de reducir la señal de fondo fosforescente. Los tratamientos del papel incluyen mantener a remojo [55] y cromatografiar con diferentes disolventes, tratamientos ácidos y básicos, calentamiento [56], blanqueo por luz solar e irradiación ultravioleta [57].

Existen otras desventajas asociadas al uso de papel de filtro. Así la superficie del papel es áspera e irregular, lo que por una parte ofrece alguna protección

a los fosforóforos al eludir la atenuación por el oxígeno [50]. Sin embargo, los numerosos intersticios presentes entre las fibras pueden ser perjudiciales. Las fibras son opacas y pueden impedir la excitación luminosa de aquellas moléculas situadas en los intersticios, perdiéndose emisión luminosa que no alcanza el detector. Esto se hace extensivo para la entrada de las moléculas en la zona mas interna del papel de filtro. Por otra parte, junto con la penetración, hay también una migración cromatográfica de las especies depositadas sobre la superficie. Estos factores afectan a la precisión y a la exactitud del análisis. El substrato ideal debería permitir que todo el analito permaneciese en la superficie [52, 59-67].

Aplicaciones analíticas de la fosforimetría a temperatura ambiente. La fosforimetría a temperatura ambiente es una técnica sensible, práctica y eficiente para la identificación y cuantificación de gran número de compuestos orgánicos tanto en mezclas simples como en muestras reales de mayor complejidad. En estas ventajas hay que incluir su simplicidad, el corto tiempo de análisis que necesita, bajo costo y la posibilidad de usar instrumentos portátiles para aplicaciones de campo. Los aspectos analíticos de esta técnica así como sus aplicaciones en diferentes campos has sido revisados en diversas ocasiones; así por Vo-Dinh y Winefordner [68] y en los libros de Hurtubise [46] y Vo-Dinh [52]. Por ello aquí, y de forma muy breve, vamos a señalar los principales campos en los que se ha usado la fosforimetría a temperatura ambiente desde hace mas de 20 años.

Entre los campos a que ha sido aplicada destacan el farmacéutico, clínico y forense donde ha sido propuesta para el análisis de ácido p-aminobenzoico en diversas formulaciones, teofilina, bencimidazol derivados, ácido salicílico, sulfamidas así como diversas drogas de abuso tales como morfina y derivados, feniletilaminas, cannabis, etc. en muestras tales como fibra, cabello, manchas de sangre

u otras. Podemos citar, a título de ejemplo, la determinación de cocaína en saliva como medio de conocer su contenido en sangre, ya que esta correlacionada, propuesta por Campliglia y Vo-Dinh en 1998. También se puede citar la determinación de ácido nalidíxico en formulaciones farmacéuticas y en orina [69].

En análisis ambiental ha sido usada para control de contaminación atmosférica, así de heterociclos nitrogenados e hidrocarburos aromáticos policíclicos tanto en materia particulada como en aire o agua o la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en atmósferas industriales mediante el uso de un dosímetro pasivo. También podría citarse la caracterización de humo de cigarro mediante esta técnica. La determinación de aminas aromáticas potencialmente cancerígenas (anilina, cloranilinas, toluidinas, etc.) en superficies pintadas o de hormigón es otro ejemplo de aplicaciones en higiene industrial.

En el campo del análisis de pesticidas se ha usado la fosforimetría a temperatura ambiente para la identificación y determinación de estos, aunque los estudios son fundamentalmente de laboratorio sin un gran número de aplicaciones a muestras reales. Así mediante esta metodología Aaron [70] ha hecho un estudio comparativo de 32 pesticidas con vistas a su determinación mediante esta técnica observando que 18 de ellos muestran emisión fosforescente siendo posible su determinación. Vannelli y Schulman [111] han estudiado 18 pesticidas, utilizando como soporte sólido papel Whatman 42 y diferentes cationes y aniones como iones pesados, comprobando que se pueden obtener límites de cuantificación comprendidos entre 0,7 ng y 10 ng dependiendo del tipo de analito determinado. Similares valores del límite de cuantificación han obtenido Su y col. [41] para pesticidas y sustancias tóxicas, utilizando como soporte sólido, en algunos casos, un papel cambiador iónico del tipo DE-81 y Pb(II) como átomo pesado.

Sensores de fosforescencia a temperatura ambiente

Otro tipo de estrategia analítica usada para el análisis de pesticidas es el empleo de sensores de tipo óptico. Un sensor es un dispositivo, pequeño generalmente, capaz de medir continuamente la concentración o la actividad de un constituyente químico presente en muestras líquidas o gaseosas y convertir esa información química en una señal óptica analíticamente útil [33]. Idealmente, el dispositivo debe ser capaz de operar de forma continua, reversible y en tiempo real.

De las distintas técnicas aplicadas en sensores de tipo óptico, la fosforescencia es una de las de uso minoritario, aunque su potencialidad ha hecho que cada vez se este empleando en mayor extensión. Se pueden encontrar ejemplos de sensores fosforimétricos de todos los tipos de formas externas: tipo sonda, tipo sensor en flujo y tipo gota plana. Vamos a comentar a continuación algún ejemplo de cada tipo.

Como ejemplo de sensor intrínseco se puede citar el desarrollado por Campliglia y Vo-Dinh para la determinación de compuestos aromáticos policíclicos basados en un substrato de papel Whatman 4 conteniendo un átomo pesado y situado en un soporte adecuado en cuyo extremo se encuentra una fibra óptica. Tras sumergir la cabeza sensora en el problema, se excita con un láser pulsante de nitrógeno y mide la fosforescencia originada [71].

Son más habituales, sin embargo, los de tipo extrínseco, en los que se origina fosforescencia por complejación. El más simple es el que usa un nuevo polímero de órganosilicio para la determinación de uranilo en muestras ambientales que tiene la característica de retener con alta eficiencia uranilo en forma de complejo [72]. El empleo de configuraciones tipo FIA permite el diseño de sensores con buenas características. Así el empleo de derivados sulfónicos de la oxina retenido en una resina aniónica dispuesta en una cubeta de flujo permite la deter-

minación de plomo en agua de mar con un límite de detección de $0,1 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ [72]. Los mismos autores ha propuesto un sistema similar para aluminio en fluidos de diálisis [73]. De forma similar se ha usado la inmovilización de tenoiltrifluoroacetona en una resina Chelex 100 empaquetada en una cubeta de flujo para la determinación de europio (III) con un límite de detección de 10^{-9} M con un tiempo de respuesta de 60 segundos [75]. La fijación sobre la misma resina quelante anterior de 1,4-bis-(1'-fenil-3'-metil-5'-pirazolona-4'-)butanodiona permite la determinación usando una configuración FIA de gadolinio (III) aunque solo ha sido ensayado el procedimiento sobre muestras sintéticas [76]. De forma similar se ha propuesto la determinación de compuestos orgánicos con carácter complejante a través de la inmovilización de su complejo con iones metálicos. Tal es el caso de la determinación de antraciclinas a través de la fijación transitoria de su complejo de Eu (III) en un soporte no iónico [77] o la similar de tetraciclinas [78].

Otra vía usada para el desarrollo de sensores de tipo fosforescente es la de atenuación de fosforescencia por parte de algunos compuestos a través del uso de la ecuación de Stern-Volmer. Esta es una de las más antiguas aplicaciones de la fosforescencia en sensores. En la década de los años 30 Kautsky observó que algunos colorantes, tales como tripaflavina, benzoflavina, safranina, clorofila y hematoporfirina entre otros, adsorbidos sobre soportes sólidos, así sílice ó alúmina, muestran fosforescencia bajo corriente de nitrógeno [80]. Esta ha sido la base para el diseño de sensores para oxígeno, como el propuesto para trazas de este elemento entre 0,004 y 0,0005 torr [81]. Otros sistemas usados incluyen naranja de acridina adsorbido sobre Silochrome S-120 con el que se pueden monitorizar de forma continua oxígeno entre 0,06 y $1,00 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ [82]. El uso de sílice silanizada permite una mejora de los límites de detección, se han dado valores de $5\cdot 10^{-4} \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ aunque se presentan problemas en esto sensores por fotoabsorción de oxí-

geno por el colorante lo que origina distorsión de la representación de Stern-Volmer a altos niveles de iluminación [82].

Se han descrito otros tipos de sensores para oxígeno basados en la atenuación de fosforescencia de otros tipos de compuestos químicos. Este es el caso del uso de fenantreno perdeuterado adsorbido sobre papel Whatman 1PS con el que se ha encontrado un límite de detección de 0,09% de oxígeno en nitrógeno [83] o el uso, con el mismo fin, de canforquinona con un rango de trabajo es de 0,1 – 25% [84].

La atenuación de fosforescencia de quelatos metálicos ha sido otra vía usada para análisis de oxígeno. Entre los diversos quelatos usados podemos citar los complejos de platino (II) y paladio (II) con porfirincetonas y que exhiben una fuerte fosforescencia a temperatura ambiente con rendimientos cuánticos mayores del 10%. Dado que algunas de estas porfirinas muestran insuficiente estabilidad fotoquímica y baja compatibilidad con fuentes como son los diodos emisores de luz (LED) muy usados en el diseño de sensores, se ha llevado a cabo bastante investigación para usar porfirinas modificadas bien a través de introducir sustituyentes periféricos en la molécula, como fluorosustituyentes por ejemplo, o modificar el macrociclo tetrapirrólico, así por hidrogenación [85]. La fabricación de membranas plásticas usando acetato butirato de celulosa, polimetilmetacrilato u otras ha permitido el desarrollo de sensores para oxígeno[86, 87]).

Otros quelatos como los muy habituales para el desarrollo de sensores fluorescentes para oxígeno, como son los de rutenio (II) con fenantrolina, se han usado adsorbidos sobre silicagel para el desarrollo de un sensor para oxígeno con excitación láser y detectores CCD [88]. Por último, se han usado quelatos de Al (III), Zr (IV), Ga (III) y Nb (V) con ferrón (8-hidroxi-7-yodo-5-quinolinsulfónico) encapsulados en películas de silicona, fijados en resinas de cambio aniónico o en

vidrio de tipo sol-gel e incluso en disoluciones micelares acuosas u orgánicas, para el desarrollo de sensores de oxígeno, con muy buenas propiedades. Por ejemplo se ha publicado límites de detección de 0,0005 % en fase gas y $< 0,01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en agua [89, 90].

De forma indirecta se ha usado el sensor de oxígeno basado en atenuación de fosforescencia del complejo Ferrón-Al sobre una resina de cambio aniónico para la determinación enzimática de colesterol. Para ello la enzima colesterol oxidasa inmovilizada en vidrio de poro controlado cataliza la oxidación del colesterol lo que provoca un descenso concomitante en el nivel de oxígeno, el cual es detectado por el complejo inmovilizado en una cubeta de flujo [91].

Además de para la preparación de sensores de oxígeno, se ha usado la atenuación de fosforescencia para la determinación de otros compuestos. Este es el caso del sulfito que atenúan considerablemente la señal del complejo platino (II) coproporfirina conjugado con albúmina de suero bovino fijado en una membrana de inmutioafinidad [92].

Nuevamente los complejos de porfirinas con paladio y platino se han propuesto como membranas sensoras tipo Langmuir-Blodgett, en este caso para la determinación de óxidos de nitrógeno usando la atenuación dinámica de fosforescencia [93]).

OBJETIVOS

Uno de los objetivos del grupo de investigación dentro del cual se ha desarrollado esta Tesis Doctoral es la puesta a punto de metodología analítica sencilla con la cual se pueda abordar la resolución de problemas analíticos reales. En este sentido se trabajó durante años en la espectrofotometría en fase sólida y posteriormente en la espectrofluorimetría en fase sólida.

En esta Memoria de Doctorado se pretende continuar con este planteamiento general aunque usando la fosforescencia a temperatura ambiente en fase sólida como técnica para obtener la señal analítica y como soportes sólidos dos tipos de ellos que involucran concepciones metodológicas muy diferentes.

En primer lugar la fosforescencia a temperatura ambiente sobre papel, bien conocida desde hace años y simple en su ejecución y medida. La deposición de un microvolumen del problema o de un extracto del mismo, en unas condiciones dadas de pH y tipo y concentración de átomo pesado, su secado y medida de fosforescencia en una atmósfera seca de gas inerte permite la determinación analítica. Aquí tratamos de simplificar las condiciones de trabajo intentando efectuar las medidas de fosforescencia sin necesidad de utilizar atmósfera inerte, para lo cual se ensayaron diversas formas de secado de la muestra y el empleo de láminas de cuarzo en el momento de realizar la medida. Se pretende también mejorar la reproducibilidad de esta técnica a través de la medida de la fosforescencia transmitida en lugar de la usual reflejada así como mediante la mejora de la reproducibilidad en la deposición del volumen de muestra.

Con esta metodología se consigue una buena sensibilidad pero no permite un proceso de preconcentración del analito, lo que permitiría aumentar la sensibilidad.

Por ello se usan también es esta Memoria de Doctorado sensores de tipo fosforimétrico. En concreto sensores del tipo que podemos denominar de gota plana. Son estos tiras reactivas que contienen en una o varias capas los reactivos necesarios para que se den las reacciones y procesos necesarios para conseguir una respuesta del problema por simple deposición de un volumen del mismo sobre el sensor o bien por inmersión en la disolución problema. De esta forma tratamos de lograr la máxima simplificación al reducir de forma considerable el proceso analítico y permitir una preconcentración del analito.

Los objetivos en esta ocasión son el desarrollo de un sensor de un solo uso que sea transparente a la radiación para medir la fosforescencia por transmisión y que presente una señal de fondo lo mas baja posible. El mecanismo de retención a ensayar será por reparto al objeto de poder conseguir factores de preconcentración adecuados para su uso en análisis de trazas.

El campo de aplicación de la metodología a desarrollar será el de la determinación de trazas de contaminantes orgánicos, concretamente pesticidas ampliamente utilizados en agricultura, contenidos en diferentes tipos de matrices tales como aguas naturales y residuales y productos agrarios (lechuga, pepino, judías, pimientos, etc.) para los que estos pesticidas son utilizados con asiduidad.

BIBLIOGRAFÍA

1. Matsumura. *Toxicology of Insecticides*, Plenum Press, NY (1976).
2. J. Mitchel. *J. Assoc. Off. Agric. Chem.*, 44, 643 (1961).
3. J. Williams. *The metabolism and detoxication of drugs, Toxic substance and other organic compounds*, 2ª edición, Willey, NY (1959).
4. R.A. Henry, J.A. Schmit y J.F. Dieckman. *Anal. Chem.* 43, 1053 (1971).
5. J.G. Kirchner y G. Rice. *J. Agric. Food Chem.* 2, 1031 (1954).
6. J.C. Márquez, M. Hernández y F. García Sánchez. *Analyst* 115, 1003 (1992).
7. F. García Sánchez. *Anal. Chim. Acta* 259, 61 (1992).
8. J.L. Vilchez, A. Navalón, R. Avidad, T. García-López y L.F. Capitán. *Analyst* 118, 303 (1993).
9. F. Capitán, E. Manzano, J.L. Vilchez y L.F. Capitán. *Anal. Sci.* 5, 549 (1989).
10. F. Capitán, E. Manzano, A. Navalón, J.L. Vilchez y L.F. Capitán. *Analyst* 114, 969 (1989).
11. F. Capitán, A. Navalón, J.L. Vilchez y L.F. Capitán. *Talanta* 37, 193 (1990).
12. J.L. Vilchez, A. Navalón, G. Sánchez-Palencia, R. Blanc y R. Avidad. *Anal. Lett.* 27, 2355 (1994).
13. F. Capitán, J.P. De Gracia, A. Navalón, L.F. Capitán y J.L. Vilchez. *Analyst* 115, 849 (1990).
14. F. Capitán, L.F. Capitán y J.L. Vilchez. *Quim. Anal.* 10, 21 (1991).
15. F. Capitán, E. Manzano, A. Navalón, J.L. Vilchez y L.F. Capitán. *Talanta* 39, 21 (1992).
16. F. Capitán, G. Sánchez-Palencia, A. Navalón, L.F. Capitán y J.L. Vilchez. *Anal. Chim. Acta* 259, 345 (1992).

17. F. Capitán, E.J. Alonso, R. Avidad, L.F. Capitán y J.L. Vilchez. *Anal. Chem.*, 65, 1336 (1993).
18. L.F. Capitán, R. Avidad y J.L. Vilchez. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 77, 1651 (1994).
19. L.F. Capitán, E.J. Alonso, R. Avidad, M. Del Olmo y J.L. Vilchez. *Anal. Sci.* 9, 117 (1993).
20. L.F. Capitán, R. Avidad, M. Del Olmo y J.L. Vilchez. *Anal. Lett.*, 26, 2443 (1993).
21. L.F. Capitán, R. Avidad, M. Del Olmo y J.L. Vilchez. *Mikrochim. Act.*, 112, 55 (1993).
22. L.F. Capitán, R. Avidad, M. Del Olmo y J.L. Vilchez. *Anales de Química*, 90, 125 (1994).
23. L.F. Capitán, R. Avidad, M. Del Olmo y J.L. Vilchez. *Analyst*, 119, 1211 (1994).
24. J.L. Vilchez, A. Navalón, R. Avidad, J. Rohand y L.F. Capitán. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 345, 716 (1993).
25. L.F. Capitán, J. Rohand, A. Navalón, R. Avidad y J.L. Vilchez. *Talanta*, 40, 1695 (1993).
26. J.L. Vilchez, A. Navalón, R. Avidad, J. Rohand y L.F. Capitán. *Anal. Chim. Acta*, 282, 445 (1993).
27. J.L. Vilchez, A. Navalón, R. Avidad, J. Rohand y L.F. Capitán. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 350, 626 (1994).
28. J.L. Vilchez, A. Navalón, R. Avidad, J. Rohand y L.F. Capitán. *Analyst*, 120, 1609 (1995).
29. J.L. Vilchez, A. Navalón, R. Avidad, J. Rohand y L.F. Capitán. *J. of Fluorescence*, 5, 225 (1995).

30. J.L. Vilchez, A. Navalón, R. Avidad, J. Rohand y L.F. Capitán. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 354, 470 (1996).
31. J.L. Vilchez, A. Navalón, R. Avidad, J. Rohand y L.F. Capitán. *Quim. Anal.*, 14, 195 (1995).
32. L.F. Capitán, J.L. Vilchez, A. Navalón y R. Avidad. *Plaguicidas: aspectos ambientales, analíticos y toxicológicos*, Editores I. Morell y L. Candela, Colección Summa. Ciencies Experimentals, Universitat Jaume I de Castellón. Pags. 259-272 (1998).
33. *Fiber Optic Chemical Sensors and Biosensors*, Vol. I Editor O. S. Wolfbeis, CRC Press, (1991).
34. T.V.Dinh. *Room Temperature Phosphorimetry for Chemical Analysis*, Ed. John Wiley & Sons, (1984).
35. R. Zweidinger y J.D. Winefordner. *Anal. Chem.*, 42, 639 (1970).
36. R. J. Hurtubise. *Phosphorimetry: Theory, Instrumentation, and Applications*, VCH Publishers Inc. N.Y. pags 7 y sigs (1990).
37. J. J. Donkerbroek, J. J. Elzas, C. Goojjer, R. W. Frei y N. H. Velthorst. *Talanta*, 28, 717, (1981).
38. A. Sanz-Medel, P. L. Martínez y M. E. Díaz, *Anal. Chem.*, 59, 774 (1987)
39. H. T. Karnes y S. G. Schulman. *Anal. Chim. Acta*, 164,257 (1984)
40. S. L. Wellons, R. A. Paynter y J. D. Winefordner, *Spectrosc. Acta* 30A, 2133 (1974).
41. S. Y. Su y J. D. Winefordner, *Microchem.*, J 27, 151 (1982).
42. A. M. Alak y T. Vo-Dinh, *Anal. Chem.*, 60, 596,1988
43. G. Ramis y I. M. Khasawneh, *Talanta*, 35, 41 (1988).
44. E.M. Schulman y C. Walling, *Science*, 178, 53 (1972).

45. J. J. Aaron, M. Andino y J. D. Winefordner, *Anal. Chim. Acta*, 160, 171 (1984).
46. R. J. Hurtubise. *Solid Surface Luminescence Analysis: Theory, Instrumentation and Aplicationes*. Marcel Dekker; New York 1981.
47. S. M. Ramasamy y R. J. Hurtubise, *Appl. Spectrosc.*, 43, 616 (1989).
48. S. L. Wellon, R. A. Paynter, J. D. Winefordner; *Spectrosc. Acta* 30 A, 2133 (1974).
49. C. D Ford y R. J. Hurtubise. *Anal. Chem.*, 50, 610 (1978).
50. E. M. Schulman y R. T. Parker, *J. Phys. Chem.*, 81, 1932 (1977).
51. A. Pal, W. Watts, J. Caraway y Vo-Dinh, *Analisis* 20, 149 (19992).
52. T.Vo-Dinh. *Room Temperature Phosphorimetry for Chemical Analysis*, Wiley Interscience; New York (1984).
53. R. T. Parker, R. S. Freedlander y R. P. Dunlap, *Anal. Chim. Acta*, 120, 1 (1980).
54. R. P. Bateh y J. D. Winefordner, *Talanta*, 29, 713 (1982).
55. J. L. Ward, E. L. Yen-Power y J. D. Winefordner, *Talanta*, 28, 119 (1981).
56. J. L. Ward, E. L. G. L. Walden y J. D. Winefordner, *Talanta*, 28, 201 (1981).
57. D. L. McAleese, R. B. Dunlap; *Anal. Chem.*, 56, 600 (1984).
58. T.Vo-Dinh, E. L. Yen-Power y J. D. Winefordner, *Talanta*, 24, 146 (1977).
59. R. A. Dalterio y R. J. Hurtubise. *Anal. Chem.*, 54, 244 (1982).
60. R. P. Bateh y J. D. Winefordner, *J. Pharm. Sic.*, 1, 113 (1983).
61. R. P. Bateh y J. D. Winefordner, *J. Pharm. Sic.*, 72, 559 (1983).
62. V. P. Senthilnathan y F. Hurtubise., *Anal. Chem.*, 56, 913 (1984).
63. L. J. Cline, M. L. Grayeski y J. Noroski., *Anal. Chim. Acta*, 170, 3 (1985).
64. E. B. Asafu y S. Y. Su., *Anal. Chem.*, 58, 539 (1986).

65. A. D. Campiglia, J. J. Laserna, Berthod y J. D. Winefordner *Anal. Chim. Acta*, 244, 215 (1991).
66. L. M. Cabalín, J. J. Laserna y A. Rupérez., *Fresenius. J. Anal. Chem.*, 346, 1003 (1993)
67. L. M. Cabalín, J. J. Laserna y A. Rupérez., *Anal. Chim. Acta*, 270, 239 (1992).
68. T. Vo-Dinh y J.D. Winefordner, *Appl. Spectros. Rev.*, 13, 261 (1977)
69. L. F. Capitán-Vallvey, F. Ojeda, M. Del Olmo, R. Avidad, A. Navalón y T. Vo-Dinh., *Appl. Spectros.*, c 52, 1, 101(1998).
70. J.J. Aaron, E.M. Kaleel y J.D. Winefordner, *Agric. Food Chem.*, 27, 1233 (1979).
71. A.D. Campliglia y T. Vo-Dinh, *Talanta*, 43, 1805 (1996).
72. A.F. Arruda, A.D. Campliglia, B.P.S. Chauhan y P. Boudjouk, *Anal. Chim. Acta*, 396, 263 (1999).
73. A.F. Arruda, A.D. Campliglia, B.P.S. Chauhan y P. Boudjouk, *Anal. Chim. Acta*, 396, 263 (1999).
74. R. Pereiro García, Y. Liu, M. Díaz García y A. Sanz-Medel, *Anal. Chem.*, 63, 1759 (1991).
75. J. Lu y Z. Zhang, *Analyst*, 120, 2585 (1995).
76. Z. Gong y Z. Zhang, *Mikrochim. Acta*, 126, 117 (1997)
77. F. Alava-Moreno, M.J. Valencia-Gonzalez y M.E. Díaz-García, *Analyst*, 123, 151 (1998).
78. F. Alava-Moreno, y A. Sanz-Medel, *Anal.Chim.Acta*, 281, 367 (1993).
79. O.S. Wolfbais, *Fiber Optic Chemical Sensors and Biosensors*, CRC Press, 1991, vol. 2, p. 42 y ss.
80. H. Kautsky y H. Hirsch, *Z. Anorg. Allg. Chem.*, 222, 126 (1935).
81. I.A. Zakharov y T.I. Grihaeva, *Zh. Anal. Khim.*, 36, 112 (1981)

82. I.A. Zakharov y T.I. Grihaeva, *Zh. Anal. Khim.*, 37, 1753 (1982)
83. S.M. Ramasamy y R.J. Hurtubise, *Talanta*, 47, 971 (1998)[
84. J.M. Charlesworth, *Sens Actuators B*, 22, 1 (1994)
85. W.L. Rumsey, J.M. Vanderkrooi y D.F. Wilson, *Science*, 241, 1643 (1988)
86. D.B. Papkovsky, G.V. Ponomarev, W. Trettnak y P. O'Leary, *Anal. Chem.*, 67, 4112 (1995).
87. A. Mills y A. Lepre, *Anal.Chem.*, 69, 4653 (1997).
88. P. Hartmann y W. Ziegler, *Anal.Chem.*, 68, 4512 (1996).
89. M.E. Díaz-García y A. Sanz-Medel, *Anal.Chem.* 66, 836 (1994).
90. J.M. Costa-Fernández, M.E. Díaz-García y A. Sanz-Medel, *Anal.Chim.Acta*, 360, 17 (1998)
91. M.J. Valencia-Gonzalez y M.E. Díaz-García, *Anal.Chem.* 66, 2726 (1994)
92. D. Papkovsky, M.A. Uskova, G.V. Ponomarev, T. Korpela, S. Kulmala y G.G. Guilbault, *Anal.Chim. Acta*, 374, 1 (1998).
93. D. Papkovsky, I.V. Desyaterik, G.V. Ponomarev, I.L. Kurochkin y T. Korpela, *Anal.Chim. Acta*, 310, 233 (1995).
94. M. J. Larkin and M. J. Day., *Anal. Chim. Acta*, 108 425-427(1979).
95. F. G. Sánchez et al. *Talanta*, 37, nº 6, 573-578 (1990)
96. M. Nakazato, et al., *Eisei Kagaku*, 34 (5) 401-407 (1988).
97. H. Shinjiro, et al., *Shokuhin Eisei Hen.*, 19, 1-5 (1988).
98. R. T. Krause., *J. Chromatogr.* 255, 497-510 (1993).
99. R. T. Krause et al., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 66(4), 1018-22 (1018-22).
100. K. Mitsuya et al., *Ishikawa-ken Eisei Kogai kenkyusho Nenpo* 28, 378-85 (1992).
101. D. M. Gilvydis et al., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 73(5), 753-761 (1990).
102. T. Pérez-Ruiz et al., *Anal. Chim. Acta*, 244, 99-204 (1991).

-
- 103.F. G. Sánchez et al., *Anal. Chim. Acta*, 259, 61-66 (1992).
 - 104.W. Schüssler., *Chromatographia*, 29, 24-30 (1990).
 - 105.C. C. Blanco and F. G. Sánchez., *Anal. Chim. Acta*, 166, 277-282 (1984).
 - 106.J. W. Bridges et al., *Biochem. J*, 96, 872 (1965).
 - 107.M. Corn and R. Berbeerich, *Clin. Chem.*, 13, 126 (1967).
 - 108.F. G. Sánchez and C. C. Blanco., *Anal. Chem.*, 60, 323-328 (1988).
 - 109.H. Otteneder, U. Hezel., *J. Chromatogr.*, 109 (1), 181-187 (1975).
 - 110.H. C. Hollified et al., *Talanta*, 14, 103 (1967).
 - 111.J.J. Vannelli, E.M. Schulman. *Anal. Chem.*, 56, 1030 (1984).

CAPÍTULO 1

METODOLOGÍA E INSTRUMENTACIÓN

ÍNDICE DEL CAPÍTULO 1

1. METODOLOGÍA ANALÍTICA.	91
1.1. Espectrofosforimetría en fase sólida	91
1.2. Preparación de la muestra.	92
1.3. Optimización de los parámetros experimentales.	98
<i>a) Espectros de fosforescencia de excitación y emisión.</i>	98
<i>b) Parámetros instrumentales.</i>	98
<i>c) Parámetros de la muestra.</i>	99
1.4. Medida de la señal analítica.	99
2. TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS ANALÍTICOS	100
2.1. Rechazo de valores anómalos.	101
2.2. Calibración lineal univariante.	102
2.2.1. <i>Desviación estándar de la regresión.</i>	103
2.2.2. <i>Desviación estándar del término independiente.</i>	104
2.2.3. <i>Desviación estándar de la pendiente.</i>	104
2.2.4. <i>Intervalos de confianza para el término independiente y la pendiente.</i>	104
2.2.5. <i>Coefficientes de correlación lineal y de determinación.</i>	105
2.2.6. <i>Desviación estándar de la señal analítica.</i>	105
2.2.7. <i>Desviación estándar de la concentración.</i>	106
2.3. Validación de un método analítico.	106
2.3.1. <i>Parámetros de fiabilidad.</i>	107
2.3.2. <i>Método de calibrado por adición de patrón.</i>	112
2.4. Modelos de calibración multivariante.	119
3. MEDIOS MATERIALES	133
3.1. Instrumentación y material de laboratorio.	133
3.2. Reactivos y disoluciones.	135
3.2.1. <i>Disolventes.</i>	136
3.2.2. <i>Patrones de pesticidas.</i>	136
3.2.3. <i>Disoluciones empleadas.</i>	137
3.2.4. <i>Soporte sólidos ensayados.</i>	138
3.2.5. <i>Ordenadores y programas informáticos.</i>	139
4. MÉTODOS DE CONTRASTE.	140
5. BIBLIOGRAFÍA	141

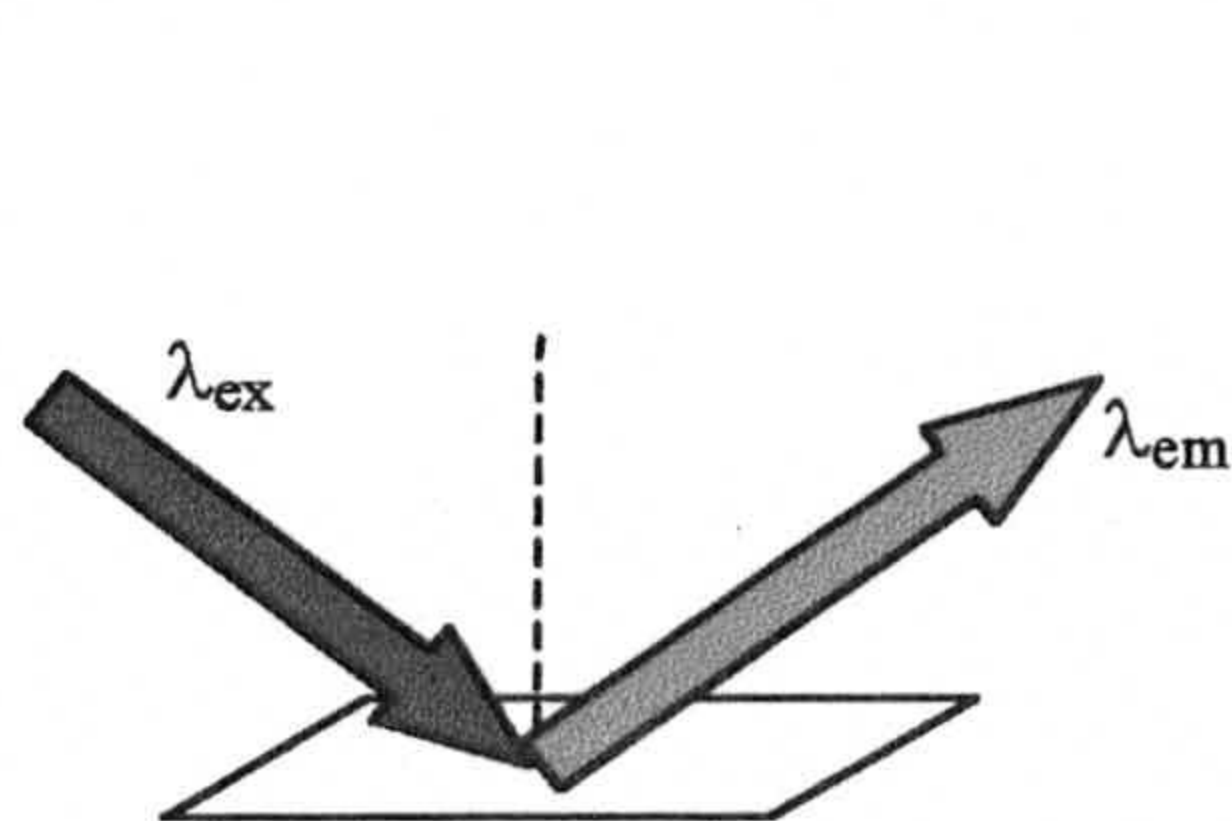
En este primer capítulo se exponen las distintas metodologías analíticas que se han utilizado en el desarrollo de esta Memoria, así como las metodologías para modelos de calibración y tratamiento estadístico de los resultados experimentales.

Como técnica analítica para la determinación del analito, o mezcla de analitos, se ha empleado la espectrofosforimetría difusa en fase sólida y a temperatura ambiente y como señal analítica se ha usado la intensidad de fosforescencia transmitida. Para el tratamiento de las señales analíticas hemos utilizado tanto los métodos de calibración univariante como los de calibración multivariante en los casos que así lo exigían. En los apartados que siguen vamos a ver en qué consiste y de qué forma hemos aplicado estos métodos de trabajo.

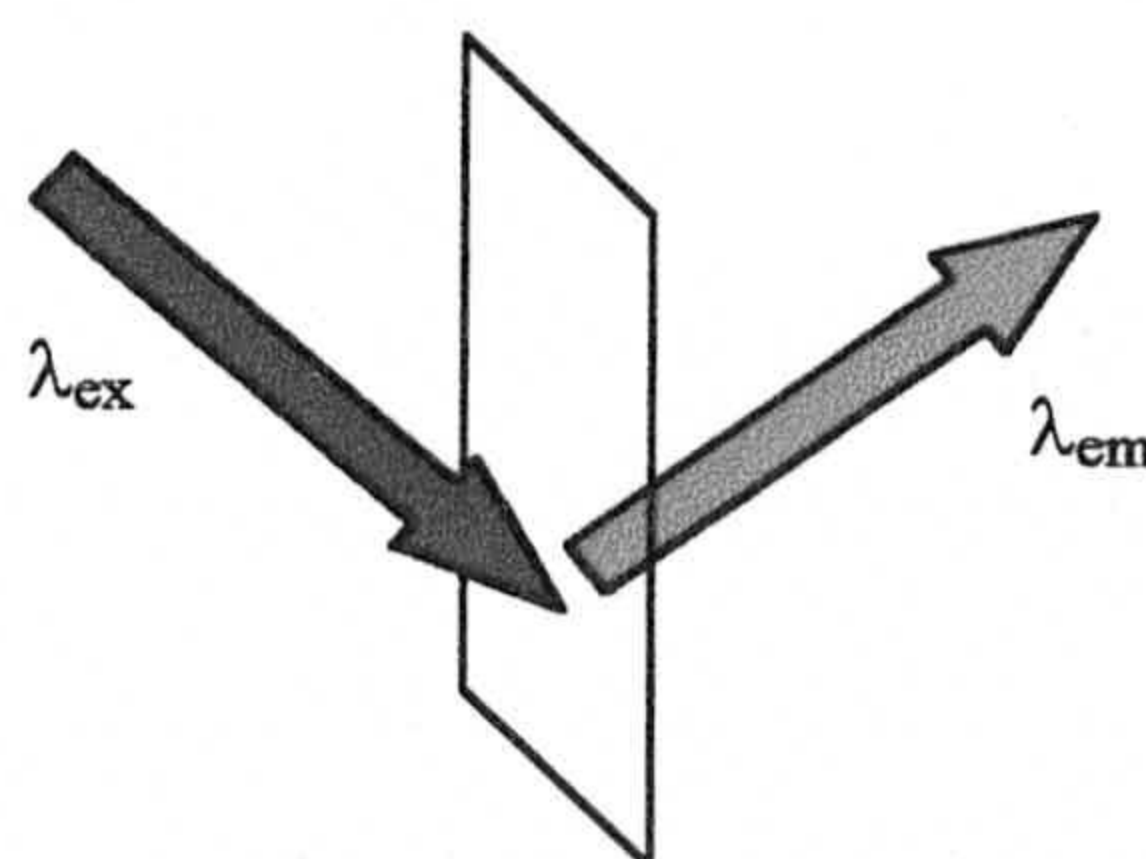
1. METODOLOGÍA ANALÍTICA.

1.1. Espectrofosforimetría en fase sólida.

En espectrofosforimetría en fase sólida (EFS), cuyo fundamento teórico hemos visto en la Introducción de esta Memoria, se pretende fijar el analito, o mezclas de analitos, sobre un soporte sólido adecuado en el que directamente se efectuarán las medidas de fosforescencia a temperatura ambiente. Dependiendo de la forma en que se realice la medida, esta puede ser de dos tipos: fosforescencia reflejada, cuando lo que medimos es la fosforescencia emitida desde la misma su-



Fosforescencia reflejada



Fosforescencia transmitida

perficie del soporte sobre el que incide el haz de excitación y fosforescencia transmitida cuando lo que medimos es la fosforescencia difusa emitida desde la superficie del soporte opuesto a aquel que recibe la radiación de excitación. En nuestro caso hemos medido siempre la fosforescencia difusa transmitida utilizando como soporte sólido papel de filtro en unos casos y sensores fabricados a tal efecto en otros. Estos sensores están constituidos por un soporte sólido de un material inerte (una lámina de politereftalato de etileno tipo Mylar) sobre la que se encuentra depositada una fina capa sólida formada por los reactivos adecuados para fijar el analito o los analitos.

Cuando se trata de medir un solo analito el proceso de calibración utilizado ha sido univariante mientras que el caso de varios analitos, de parecidas características fosforescentes, la resolución de la mezcla se ha llevado a cabo mediante la utilización del apropiado método de calibración multivariante.

Mediante la aplicación de la espectrofotometría, la utilización de soportes y sensores de diversa naturaleza y la aplicación de métodos de calibración adecuados al problema planteado en cada caso, hemos podido determinar diferentes pesticidas en muestras reales tan complejas como son: frutas y hortalizas, aguas residuales, agua de mar y fluidos biológicos, a unos niveles de concentración del orden de los $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

1.2. Preparación de la muestra.

La metodología seguida para la preparación de la muestra difiere de unos casos a otros dependiendo de que el soporte sólido sobre el que se fija el analito, o analitos, sea papel de filtro o se trate de un sensor. El motivo de esta diferente forma de actuar se debe tanto a la distinta composición de uno y otro soporte sólido.

do, como a la distinta filosofía que entraña su uso. En el caso de utilizar papeles de filtro como soporte sólido, lo que se pretende es mejorar las características analíticas y la sencillez en el uso de la EFS y para ello se depositan el analito y los reactivos necesarios sobre el papel en el que a continuación se efectúa la medida, mientras que en el caso de sensores lo que se pretende es poner a punto métodos de análisis en los que un sensor, previamente construido, se introduce en la disolución de analito, o analitos, y tras la fijación de este sobre el sensor se efectúa la medida de la señal analítica, teniendo lugar un proceso de preconcentración paralelo a su fijación. En este caso se persigue disponer de métodos de análisis rápidos, económicos y en los que todos los reactivos necesarios se encuentren incluidos en la zona sensora de la lámina que, a la vez, goce de las características analíticas de la espectrofosforimetría, es decir, gran sensibilidad y alta selectividad. Pasamos pues a describir la forma de actuar en cada caso.

Papeles de filtro. En el caso del papel de filtro la metodología de preparación de la muestra es como sigue: una vez elegido el papel adecuado, se cortan tiras de 4,5

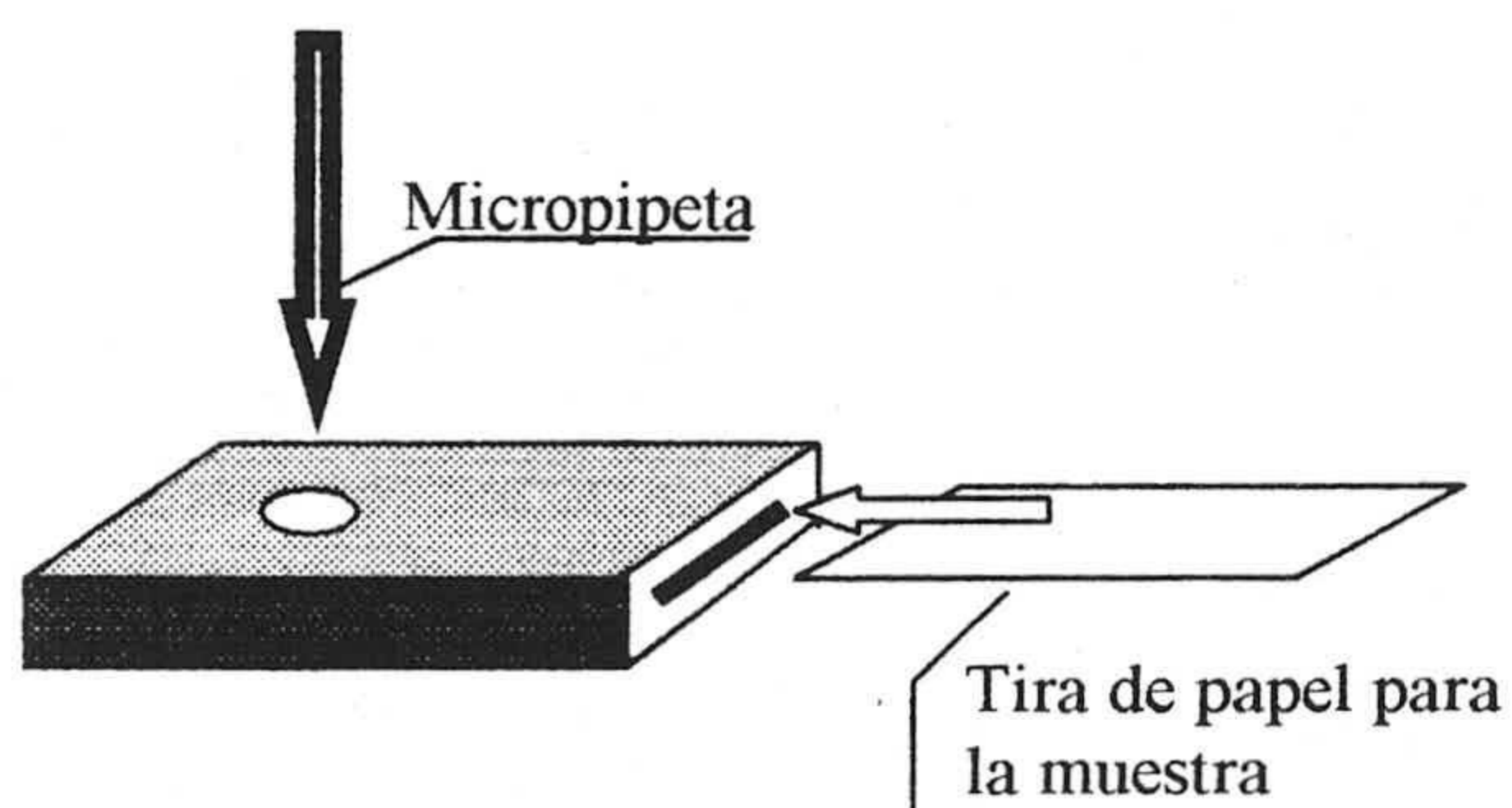


Figura 1.1 Dispositivo para depositar la muestra

cm de longitud por 1,2 cm de ancho y una de ellas se introduce en el dispositivo que podemos ver en la figura 1.1. Este dispositivo fue diseñado con el fin de hacer reproducible el punto de colocación de los reactivos y el analito sobre

la tira de papel para mejorar así la reproducibilidad de las medidas efectuadas y consiste en un prisma rectangular cuyas dimensiones son 5x3x1 cm, construido con

láminas de metacrilato que presenta una ranura lateral por la que se introduce la tira de papel soporte para la muestra. La longitud y anchura de la ranura son iguales a los de la tira de papel con lo cual este queda siempre en la misma posición al depositar los reactivos y la muestra por el orificio superior que presenta el dispositivo.

Mediante el uso de una micropipeta se depositan los reactivos correspondientes (disolución de átomo pesado y disolución reguladora de pH, si son necesarias) sobre la tira de papel, en el lugar indicado en la figura 1.1, y a continuación se deposita el volumen adecuado de disolución de muestra haciendo también uso de la micropipeta.

A continuación se saca la tira de papel y se coloca horizontalmente sobre un soporte, de forma que la parte humedecida no toque el soporte, y se procede a secar la muestra mediante una corriente de aire caliente procedente de un secador de pelo doméstico de 300 vatios de potencia, colocado a una distancia fija de unos

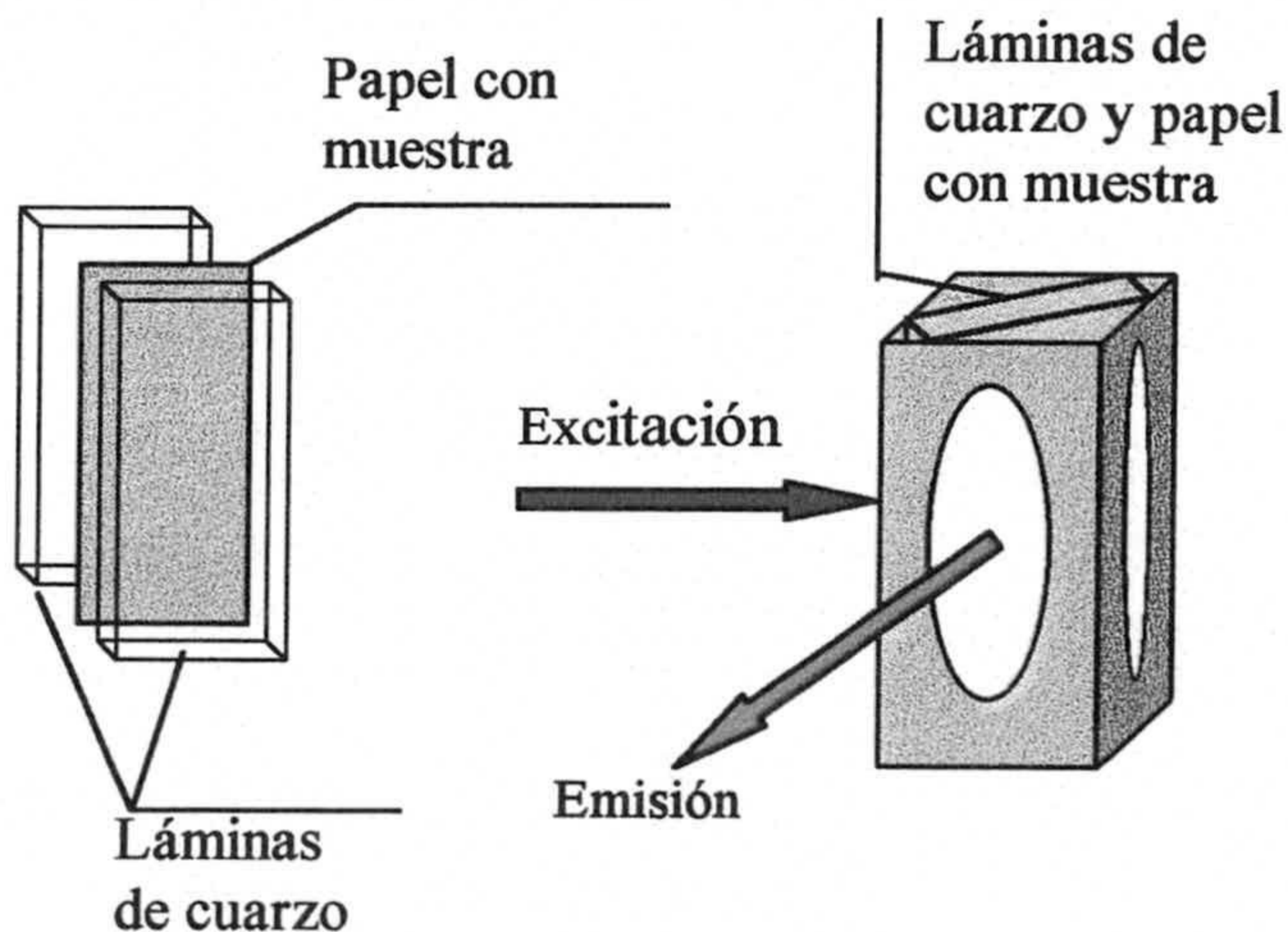


Figura 1.2 Colocación de la muestra en el dispositivo de medida.

siete centímetros por encima de la tira de papel. La operación de secado suele durar unos tres minutos dependiendo del tipo de muestra y de papel que estemos utilizando. Una vez que la tira de papel con la muestra se encuentra seca, se coloca entre dos láminas de cuarzo de dimensiones 45x12x1mm y todo el

conjunto se dispone en el interior del accesorio portamuestras de que dispone el instrumento que hemos usado (Véase figura 1.2).

El conjunto formado por el accesorio con la tira de papel y las láminas de cuarzo en su interior, se introduce finalmente en el compartimento de cubetas del espectrofotómetro de luminiscencia de manera que la radiación de excitación incida sobre una de las caras de la tira de papel y la radiación que llegue hasta el detector del instrumento sea la que procede de la cara opuesta. En esta disposición, ambos haces (excitación y emisión) forman ángulos de 45° cada uno de ellos con la superficie del papel que contiene la muestra.

Sensores. En el caso de utilización de sensores hemos de distinguir entre la preparación previa del sensor y el proceso de fijación del analito sobre él. Para preparar

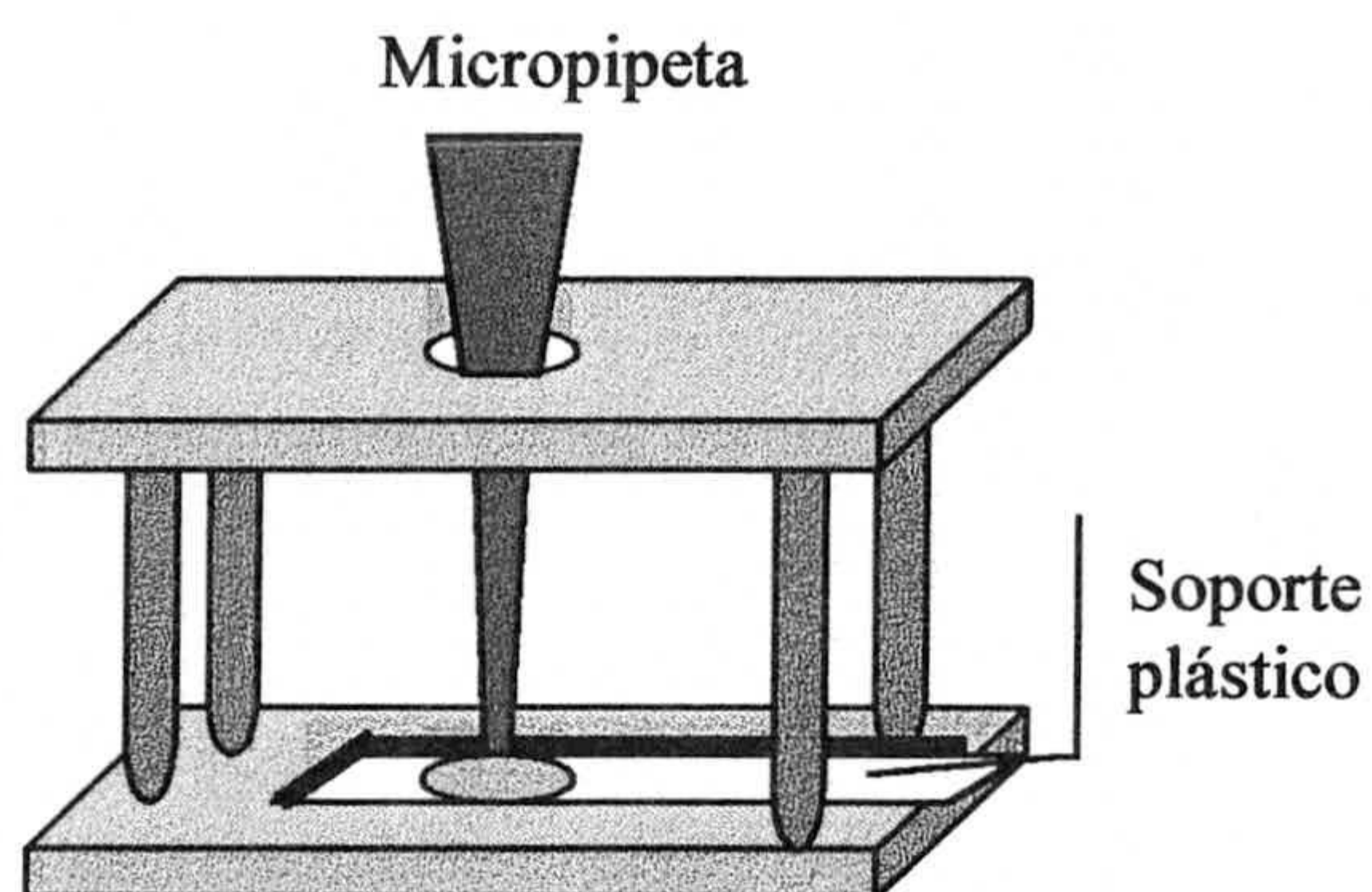


Figura 1.3. Dispositivo utilizado para la obtención del sensor depositando la mezcla de reactivos con una micropipeta.

el sensor se procede como sigue: de una lámina de politereftalato de etileno orientado biaxialmente, de 0,25 mm de espesor, se cortaron tiras rectangulares de 3,6 cm de largo y 1,8 cm de ancho. A continuación, en un frasco de vidrio de 10 mL de capacidad con tapón de rosca, se pesaron 100 mg de cloruro de polivinilo de alto peso molecular (0,65 de vis-

cosidad) y se le añadieron 1,0 mL de tributilfosfato y 3,5 mL tetrahydrofurano, agitándose la mezcla hasta total disolución y homogeneización de la misma. Utilizando el dispositivo que podemos ver en la figura 1.3, con ayuda de una micropipeta de punta desechable, se depositan 5 μL de esta disolución sobre la superficie

de la tira de politereftalato de etileno. A continuación se saca la tira del dispositivo y se introduce en un desecador en el que se hace vacío durante 20 minutos, con lo cual el sensor queda totalmente solidificado y preparado para su utilización. Al so-

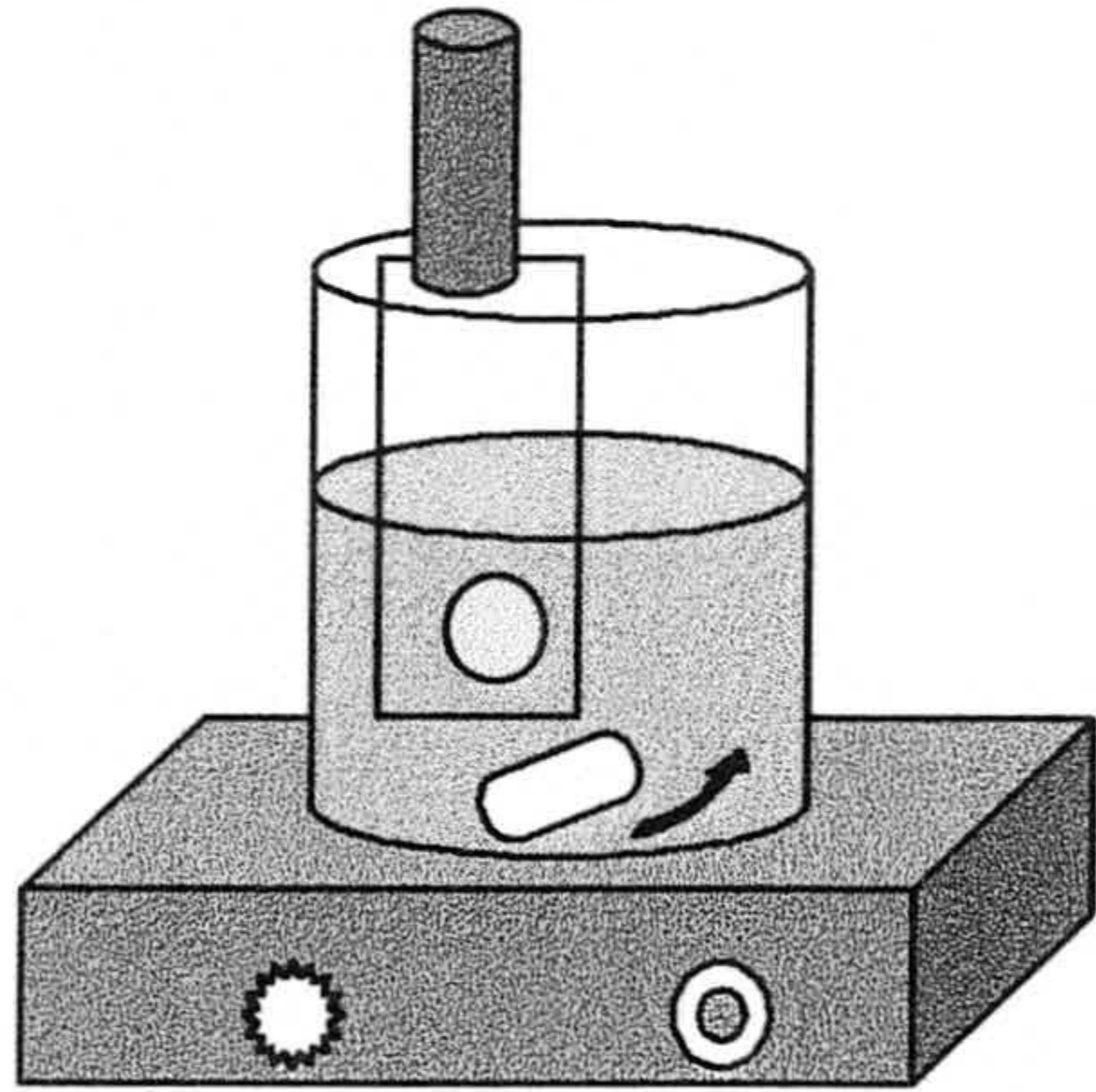


Figura 1.4. Agitación magnética de la disolución con el sensor.

lidificar, el volumen de disolución depositado sobre la tira adquiere la forma de un círculo de seis milímetros de diámetro y $25 \mu\text{m}$ de espesor, valor este que se obtuvo mediante microscopía de barrido electrónico.

Obtenido el sensor, el proceso de fijación del analito sobre él, se lleva a cabo de la siguiente forma: en un vaso de precipitado de 50 mL se colocan 25 mL de la disolución de patrón o de muestra que contiene el analito, se introduce en

ella el sensor colgado de una varilla soporte mediante una pinza y el conjunto se coloca sobre un agitador magnético, agitándose durante 2 horas a una velocidad de

4 rps (véase figura 1.4). Al agitar, se ha de procurar que el flujo de disolución que incide sobre la parte activa del sensor sea uniforme evitando las turbulencias que se originan en el centro de la masa líquida.

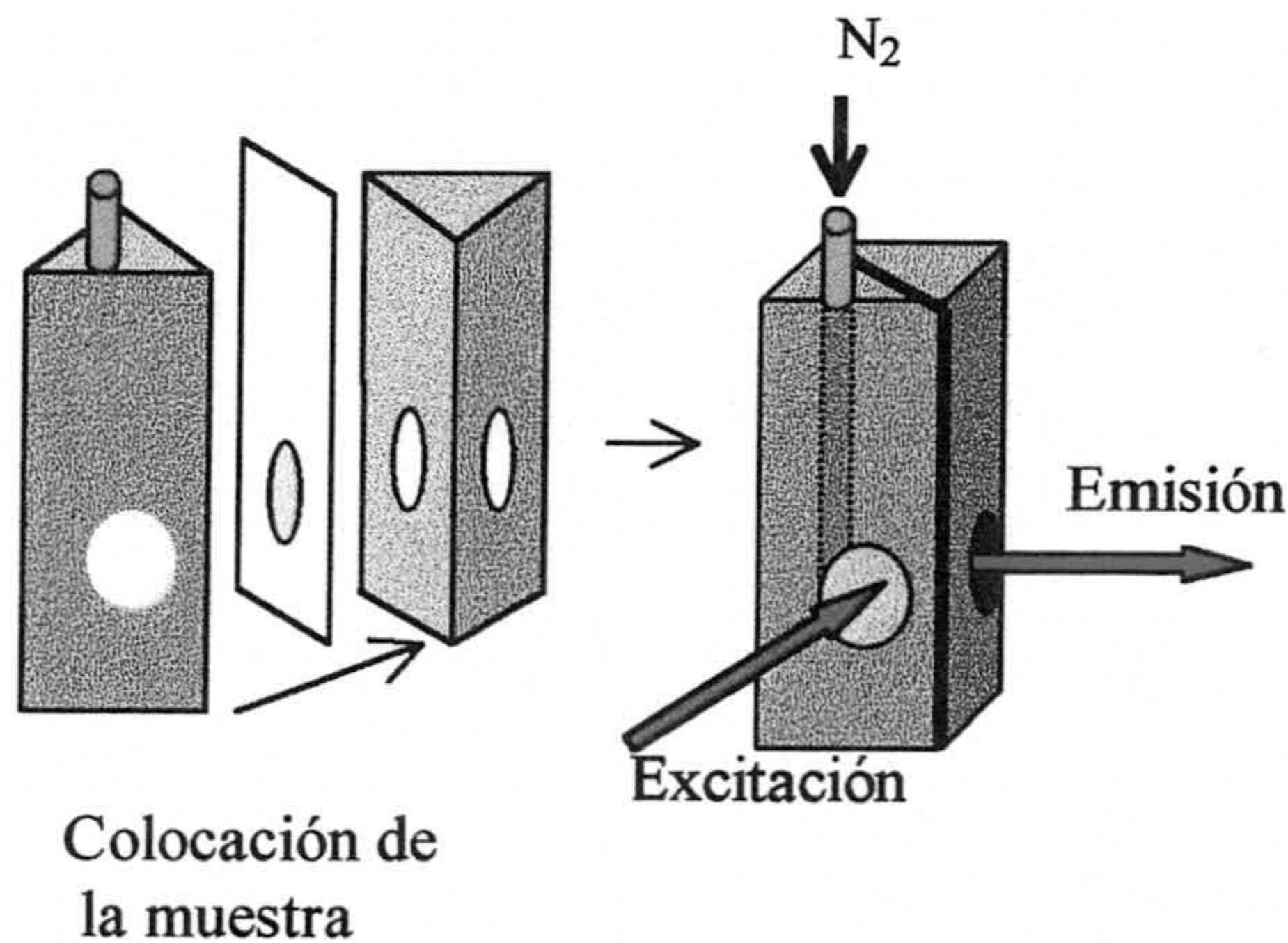


Figura 1.5. Colocación del sensor para la medida.

Finalizada la agitación se saca el sensor de la disolución y se introduce en un dese-

gador a vacío durante 5 minutos, transcurridos los cuales estará preparado para efectuar la medida. La medida de la intensidad de fosforescencia emitida se lleva a cabo utilizando el dispositivo que podemos ver en la figura 1.5. Consiste en dos prismas de base triangular metálicos y pintados de negro mate que al unirlos forman un prisma de base cuadrangular de 13 mm de lado y 44 mm de alto que se acopla al portacubetas que posee el instrumento de medida. En uno de los dos prismas triangulares existe un orificio que conecta internamente una de las bases del prisma con la zona donde queda la parte activa del sensor, cuando este se encuentra entre ambos prismas, con lo cual podemos introducir una corriente de gas seco en la zona donde se encuentra dicha parte activa, mientras se efectúa la medida de fosforescencia. En esta zona los prismas poseen sendos orificios circulares de 7 mm de diámetro que, cuando el conjunto se encuentra introducido en el compartimento de medida del instrumento, el haz de excitación y el haz de emisión pasan a través de ellos, como podemos ver en la figura 1.5.

Dada la disposición del sensor en el accesorio del compartimento de medida del espectrómetro, dichos haces de radiación forman ángulos de 45° con el plano del sensor, por lo que las medidas efectuadas serán de fosforescencia transmitida.

Tanto en las medidas efectuadas utilizando papel como soporte sólido como en las que se utilizan sensores, los blancos se preparan y se miden de forma idéntica, usando para ello disoluciones que contenían todos los reactivos excepto el propio analito.

La preparación de muestras reales de suero sanguíneo, hortalizas, frutas y aguas de diversa naturaleza se efectúa de manera diferente en cada caso, de acuerdo con la naturaleza de la muestra que vamos a analizar, de ahí que la metodología

de preparación de estas muestras se describa en el lugar oportuno para cada ocasión.

1.3. Optimización de los parámetros experimentales.

Preparadas las disoluciones patrón se procedió a registrar sus espectros y optimizar los parámetros experimentales, instrumentales y de la muestra, que afectan a la emisión fosforescente, de acuerdo con la siguiente metodología.

a) *Espectros de fosforescencia de excitación y emisión.*

Se prepararon disoluciones patrón de $2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ del analito en cuestión y, mediante los procedimientos descritos en el apartado anterior, se obtuvieron las correspondientes muestras analíticas en cada caso. Fijando arbitrariamente los valores de los restantes parámetros instrumentales (tiempo de retraso t_d , tiempo de apertura del detector t_g , rendijas de excitación y emisión y velocidad de barrido) se registraron los espectros de excitación y emisión fosforescentes entre 300 y 500 nm para excitación y entre 400 y 600 nm para emisión, este último utilizando la longitud de onda de excitación máxima obtenida previamente. En cada caso y en las mismas condiciones experimentales, se registraron los espectros correspondientes a los respectivos blancos. Todos los espectros se registraron obteniendo un punto experimental cada 0,5 nm, que es el valor impuesto por el instrumento utilizado, y se sometieron a un proceso de suavizado mediante el método de Savitzky-Golay [1] con ventana de 5 puntos. La velocidad de registro se fijó inicialmente en $240 \text{ nm}\cdot\text{min}^{-1}$.

b) *Parámetros instrumentales.*

Una vez obtenidos los espectros de excitación y emisión, se procedió, en cada caso, a optimizar los valores de t_d y t_g . El valor de t_d se optimizó midiendo las

intensidades de fosforescencia emitidas para diferentes valores de t_d comprendidos entre 0,01 y 1,99 ms, que son los límites impuestos por el instrumento, manteniendo constante, en todos los casos, los valores de los restantes parámetros instrumentales. Una vez optimizado el valor de t_d se procedió a la optimización de t_g entre los valores 0,01 y 11,90 ms, utilizando para ello el valor óptimo de t_d obtenido previamente. Conocidos los valores óptimos de t_d y t_g se procedió a la optimización de los valores de las rendijas de excitación y emisión, que pueden oscilar entre 2,5 y 20 nm, así como de la velocidad de barrido.

c) *Parámetros de la muestra.*

Una vez optimizados los parámetros instrumentales para cada analito en particular, se procedió a la optimización de los parámetros físicos y químicos que intervienen en el proceso de preparación de la muestra analítica así como en su medida (pH de la disolución, fuerza iónica, cantidad y tipo de disolvente, influencia de la atmósfera de nitrógeno, tiempo transcurrido para efectuar la medida contado desde la preparación de la muestra, tiempo de secado, etc.) manteniendo constantes los valores optimizados de los parámetros instrumentales.

1.4 Medida de la señal analítica.

Tras la optimización de todos los parámetros (instrumentales y de la muestra) y manteniendo siempre constantes dichos valores optimizados, se procede al estudio de las curvas de dependencia de la intensidad de fosforescencia con la concentración de analito, o analitos.

Si se trata de un solo analito la única variable que debe influir en la medida de la señal analítica es la concentración del mismo, con lo cual podemos escribir:

$$I_F = B \cdot C$$

en donde I_F es la intensidad de fosforescencia, C es la concentración de analito en la muestra y B será una constante que permanecerá invariable mientras no cambie las condiciones experimentales bajo las cuales se efectúa la medida. En estos casos utilizaremos un método de calibración univariante, en el cual la función de calibrado se obtiene mediante regresión lineal de las intensidades de fosforescencia sobre las concentraciones de los patrones. En el caso de muestras con varios analitos, se utilizó el método de calibración multivariante conocido como PLS (*Partial Least Squares*) para lo cual se registraron espectros de diferentes mezclas de concentraciones conocidas de cada uno de los componentes y se utilizó el programa informático PLSplus [2] para la obtención de la matriz de calibración correspondiente que será de la forma:

$$I_F = f(\sum k_i C_i)$$

en donde I_F es la intensidad de fosforescencia emitida por un determinado patrón que contiene n componentes cuyas concentraciones son C_i siendo k_i las respectivas constantes de proporcionalidad.

2. TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS ANALÍTICOS

Los métodos instrumentales de análisis, cuando se utilizan con fines cuantitativos, se caracterizan por la necesidad de establecer una comparación entre la señal o respuesta dada por la muestra a determinar y las señales o respuestas generadas por una serie de patrones de concentraciones conocidas, proceso al que se conoce como calibración o calibrado. Este proceso de comparación consta de dos partes, la primera pretende establecer la relación entre señal analítica y concentración de analito mediante el uso de los citados patrones, etapa a la que conocemos como calibración propiamente dicha y en la segunda se pretende estimar la con-

centración de analito (o analitos), presente en la muestra real que queremos analizar, mediante la aplicación de la función de calibración obtenida previamente, etapa de predicción. La forma de proceder en cada caso depende de que se trate de un solo componente o de varios componentes, de ahí que exponamos a continuación la metodología adoptada en cada caso. Comenzaremos por el caso de la calibración univariante para finalizar con la multivariante, suponiendo en ambos casos que los patrones contienen cantidades exactamente conocidas de analito y que dichas concentraciones no están sujetas a errores aleatorios, mientras que los valores experimentales de las señales analíticas se encuentran sujetos a errores aleatorios debidos, entre otras causas, al ruido instrumental. En tales circunstancias, la relación señal analítica-concentración se puede establecer mediante una regresión de la primera sobre la segunda.

2.1 Rechazo de valores anómalos.

Es un hecho experimental que al medir una serie de alícuotas de una misma muestra obtenemos un conjunto de valores más o menos próximos entre sí, dependiendo esta discrepancia del tipo de medida que estemos efectuando. En numerosas ocasiones, al efectuar estas medidas se obtiene algún valor que discrepa visiblemente de los restantes y, en tal caso, la duda que se nos presenta es saber si aceptamos el resultado anómalo o lo rechazamos. Si el número de datos anómalos es elevado podemos pensar que se trata de la existencia de algún fenómeno no sospechado al inicio de la experiencia, pero cuando se trata de pocos resultados discordantes el problema consiste en establecer un criterio mediante el cual podamos rechazar los valores sospechosos. En esta Memoria el criterio utilizado ha sido el test Q de Dixon [3].

2.2 Calibración lineal univariante.

En este caso, mediante el uso de patrones de concentración conocida, se obtienen una serie de pares de valores respuesta del instrumento R_i frente a concentración C_i del patrón correspondiente, relacionados entre sí por la expresión:

$$R_i = bC_i + a + e_i \quad (\text{Ec. 1.1})$$

en donde, a y b son la ordenada en el origen y la pendiente de la recta de calibrado que han de estimarse por el procedimiento más adecuado y e_i son los residuales o residuos asociados a la señal medida y cuyo origen es el error aleatorio que acompaña a esta. El residuo correspondiente a la medida de cualquier patrón, es la diferencia entre el valor observado R_i y el valor predicho por el modelo \hat{R}_i o sea:

$$e_i = R_i - \hat{R}_i \quad \text{siendo} \quad \hat{R}_i = bC_i + a$$

La estimación de los parámetros a y b se llevó a cabo mediante el método de minimización de la suma de cuadrados de los residuos, comúnmente conocido como método de "mínimos cuadrados", según el cual la ecuación que mejor se ajusta a los datos experimentales es aquella para la cual se cumple la condición siguiente: la sumatoria de los cuadrados de los residuos es mínima

$$\sum e_i^2 = \sum (R_i - \hat{R}_i)^2 \rightarrow \text{Mínimo} \quad (\text{Ec. 1.2})$$

Admitiendo el modelo lineal, la ecuación 1.2 tiene una única solución cualquiera que sea el número de patrones y medidas realizadas, de manera que:

$$b = \frac{\sum (C_i - \bar{C})(R_i - \bar{R})}{\sum (C_i - \bar{C})^2} \quad \text{y} \quad a = \bar{R} - b\bar{C} \quad (\text{Ec. 1.3})$$

donde \bar{R} y \bar{C} son respectivamente los valores medios de las señales medidas y de las concentraciones de los patrones utilizados para establecer la función de calibrado.

Obtenidos los parámetros de la regresión el siguiente paso consiste en comprobar si los residuos e_i cumplen las condiciones de *aleatoriedad*, *normalidad*, *independencia* y *homoscedasticidad*, condiciones necesarias para que el modelo establecido sea aceptable. Para ello, dado el número de réplicas de cada patrón, en lugar de utilizar los test estadísticos recomendados a tal efecto (Durbin-Watson, Barlett y D'Agostino), con lo cual el tratamiento sería tedioso, se ha adoptado el criterio, menos riguroso pero más práctico, de representar los valores de los residuales frente a concentraciones y observar la forma de la distribución de los puntos en dichas gráficas.

Admitiendo que se cumplen las condiciones de aleatoriedad, homoscedasticidad, independencia y normalidad, se procede a continuación a calcular los parámetros de la regresión que nos indican los errores cometidos al establecer la regresión. Estos parámetros son: desviaciones estándar de la regresión, de la pendiente y de la ordenada en el origen, coeficientes de correlación lineal y de determinación y los intervalos de confianza de la pendiente y del término independiente.

2.2.1. Desviación estándar de la regresión. También conocida como desviación estándar de los residuales ($s_{R,C}$) nos mide la dispersión de las señales analíticas producidas por los patrones, con respecto a la recta de calibrado obtenida mediante el ajuste. Este valor será cero si todos los valores medidos experimentalmente se encuentran sobre la recta de ajuste y será tanto mayor cuanto más desviados estén los puntos a un lado y otro de la recta. Su valor nos indica, aproximadamente, la bondad del ajuste de datos experimentales a la recta. Para el cálculo de este parámetro utilizaremos la ecuación siguiente:

$$s_{R,C} = \sqrt{\frac{\sum (R_i - \hat{R}_i)^2}{n - 2}} \quad (\text{Ec. 1.4})$$

donde las variables tienen el significado que hemos indicado anteriormente y n es el número de parejas de valores señal-concentración que hemos utilizado en el cálculo de la regresión.

2.2.2 Desviación estándar del término independiente. Originalmente este parámetro nos indica el error máximo que se puede cometer al predecir un valor de la señal analítica que produciría una determinada concentración de analito en un patrón. Esta desviación es mínima en el centro de la recta de calibrado y máxima en los extremos, de ahí que el valor de s_a sea el que corresponde al extremo inferior de dicha recta. Su cálculo se lleva a cabo mediante la expresión:

$$s_a = s_{R,C} \sqrt{\frac{\sum C_i^2}{n \sum (C_i - \bar{C})^2}} \quad (\text{Ec. 1.5})$$

donde cada una de las variables tiene el significado que ya conocemos.

2.2.3 Desviación estándar de la pendiente. Parámetro este que nos indica el error cometido al estimar la pendiente de la recta de regresión. El valor de esta desviación estándar afectará a todos los valores que se calculen a partir de la recta de regresión. Su valor viene dado por la expresión:

$$s_b = s_{R,C} \sqrt{\frac{1}{\sum (C_i - \bar{C})^2}} \quad (\text{Ec. 1.6})$$

siendo \bar{C} es el valor medio de las concentraciones de los patrones empleados para obtener la recta de regresión.

2.2.4 Intervalos de confianza para el término independiente y la pendiente. A partir de los valores de las desviaciones estándar de la pendiente y del término independiente, junto con el valor del estadístico t de Student, podemos calcular los intervalos de confianza de ambos parámetros para un determinado nivel de signifi-

cación $1-\alpha$ y $n-2$ grados de libertad. Para ello utilizaremos las ecuaciones siguientes:

$$\Delta b = b \pm s_b t_{(\alpha, n-2)} \quad \text{y} \quad \Delta a = a \pm s_a t_{(\alpha, n-2)} \quad (\text{Ec. 1.7})$$

2.2.5 Coeficientes de correlación lineal y de determinación. El primero de ellos es una medida del grado de correlación entre las concentraciones de los patrones y las respectivas señales analíticas medidas experimentalmente, mientras que el segundo, que es una medida de la fracción de la variabilidad total explicada por la regresión, nos sirve como índice de la calidad del ajuste de los puntos experimentales al modelo adoptado. Las ecuaciones para el cálculo de estos coeficientes son:

$$r = \frac{\sum (C_i - \bar{C})(R_i - \bar{R})}{\sqrt{\sum (C_i - \bar{C})^2 \sum (R_i - \bar{R})^2}} \quad (\text{Ec. 1.8})$$

en donde r es el coeficiente de correlación lineal y las restantes variables tienen el significado que ya conocemos. El coeficiente de determinación es el cuadrado del coeficiente de correlación lineal, o sea, r^2 .

2.2.6 Desviación estándar de la señal analítica. Un dato significativo de la variabilidad a la que está sujeta la señal analítica medida a partir de una determinada concentración conocida de patrón es la desviación estándar de la señal s_R dada por la expresión:

$$s_R = s_{R,C} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{m} + \frac{(C - \bar{C})^2}{\sum (C_i - \bar{C})^2}} \quad (\text{Ec. 1.9})$$

en donde m es el número de réplicas de cada patrón utilizadas en el ajuste, C es el valor de concentración del patrón del que queremos predecir su concentración y los restantes símbolos tienen el significado ya conocido. De esta expresión se deduce que la desviación de las medidas de este parámetro será tanto menor cuanto

mayores sean el número de parejas de patrones utilizados en la calibración y el número de réplicas de cada uno de ellos.

2.2.7 Desviación estándar de la concentración. Un parámetro importante en el momento de expresar los resultados del análisis de una muestra real, es el intervalo de confianza dentro del cual, con un determinado grado de significación, se encuentra el valor estimado de la concentración. Para establecer este intervalo de confianza podemos utilizar la desviación estándar de la concentración dada por la expresión:

$$s_c = \frac{s_{R,C}}{b} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{m} + \frac{(R - \bar{R})^2}{b^2 \sum (C_i - \bar{C})^2}} \quad (\text{Ec. 1.10})$$

en la que el error asociado a la medida de concentración de la muestra lleva implícitos los errores de la pendiente, de la medida de la señal analítica y de la ordenada en el origen o término independiente. En la anterior expresión m es el número de réplicas utilizadas para el análisis de la muestra y C_i los valores de concentración de dichas réplicas.

2.3 Validación de un método analítico.

Una vez que hemos establecido el modelo de calibrado y se ha comprobado su validez mediante el estudio de los parámetros estadísticos que acabamos de ver, a continuación procede validar el método analítico para comprobar si cumple una serie de requisitos que, en conjunto, nos indican su idoneidad para un fin determinado. Dicha idoneidad se establece mediante los *parámetros de calidad* del método [4,5] que pueden ser de dos tipos: *parámetros de fiabilidad* que son de carácter químico/estadístico y determinan la capacidad del método para cumplir los requisitos químico-analíticos de la validación y *parámetros o características de practi-*

cabilidad que cualifican al método desde un punto de vista económico-operativo del mismo. Entre los primeros se encuentran los siguientes parámetros: *exactitud* y *precisión*, que son los fundamentales, *sensibilidad*, *selectividad*, *linealidad*, *límites superior e inferior*, *rango dinámico lineal* y *robustez* y entre los segundos cabe citar los siguientes: *rapidez* y *coste del análisis*, *disponibilidad*, *seguridad* y *facilidad de manejo*.

2.3.1 *Parámetros de fiabilidad.*

Los parámetros de fiabilidad utilizados en esta Memoria como parte de la validación de los métodos propuestos son:

a) *Linealidad:* Por linealidad se entiende la capacidad del método para obtener resultados analíticos relacionados linealmente con la concentración de analito en la muestra dentro de un intervalo de concentraciones. Esta linealidad puede entenderse de dos formas distintas: la primera en el sentido que indica el Analytical Methods Committee [6] que recomienda el uso del test de *fallo de ajuste* para detectar la posible curvatura de la recta de calibrado y la segunda, propuesta por Cuadros y col.[7] que nos indica la dispersión de los datos experimentales del calibrado alrededor de la recta, una vez que se ha comprobado la linealidad mediante el fallo de ajuste dentro de un intervalo de concentraciones establecido.

Para aplicar el test de fallo de ajuste, al obtener los datos experimentales necesarios para la regresión, se preparan m réplicas de cada uno de los k patrones de concentraciones diferentes C_i , que darán lugar a un total de n parejas de valores concentración-respuesta. Con estos datos se calculan las varianzas s_{FA}^2 y s_{EP}^2 asociadas a la falta de ajuste y al error puro respectivamente y se calcula el estadístico F_{cal} mediante la expresión:

$$F_{cal} = \frac{M_{FA}}{M_{EP}} \quad (\text{Ec. 1.11})$$

Este valor calculado se compara con el valor tabulado (F_{tab}) para el nivel de confianza deseado α con $k-2$ y $n-k$ grados de libertad y se admite la linealidad del intervalo de recta seleccionado si $F_{cal} > F_{tab}$.

La otra forma de expresar la linealidad como dispersión de los datos experimentales alrededor de la recta de regresión, la hemos calculado a partir de la expresión:

$$\text{Lin} = [1 - s_b/b] \cdot 100 \quad (\text{Ec. 1.12})$$

Donde s_b es la desviación estándar de la pendiente dada por la ecuación 1.6.

Sensibilidad: Este parámetro también se puede expresar de dos formas:

1. *Sensibilidad del calibrado:* que según recomienda la IUPAC [8] viene dada por la pendiente de la recta de calibrado.

$$\text{Sen. Cal.} = b$$

2. *Sensibilidad analítica:* definida por la expresión:

$$\text{Sen. Anal.} = b/s_R \quad (\text{Ec. 1.13})$$

Parámetro este que ha generado muchas controversias [9] y que cuantifica la capacidad del método para discriminar pequeñas diferencias de concentración entre dos patrones. El principal inconveniente de este parámetro es que depende de la concentración de la muestra, con lo cual no caracteriza al método, siendo esta la causa por la que se ha propuesto una nueva definición [10] que es independiente incluso de la técnica utilizada y que viene dada por la expresión:

$$\text{Sen Anal.} = \frac{s_{R,C}}{b} \quad (\text{Ec. 1.14})$$

en la que $s_{R,C}$ es la desviación estándar de la regresión como hemos visto anteriormente.

Limite de detección: Aunque durante los últimas décadas se han propuesto varias definiciones de este parámetro, en esta Memoria el límite de detección de un método analítico se ha calculado, de acuerdo con la recomendación de la IUPAC [8], mediante la expresión:

$$LD = \frac{3s_b}{b} \quad (\text{Ec. 1.15})$$

donde: s_{b0} es la desviación estándar calculada a partir de las respuesta dadas por una serie de réplicas del blanco y b la pendiente de la recta de calibrado. Según la IUPAC el número de réplicas recomendable es 10, criterio este que hemos seguido en esta Memoria.

Limite de cuantificación ó de determinación. El límite de cuantificación es la menor concentración de analito que puede ser determinada con aceptable precisión y exactitud. El límite de cuantificación (LQ), según la IUPAC se viene dado por la siguiente ecuación:

$$LD = \frac{10s_b}{b} \quad (\text{Ec. 1.16})$$

Intervalo dinámico lineal. Viene definido por los limites superior e inferior del intervalo de concentraciones en el que hemos aplicado el método.

$$RDL = 0'1 \frac{\text{Lim}_{\text{sup}}}{\text{Lim}_{\text{inf}}} \quad (\text{Ec. 1.17})$$

donde: Lim_{inf} es el límite de cuantificación y Lim_{sup} es el límite superior del intervalo de linealidad calculado al aplicar con el test de fallo de ajuste.

Precisión: La precisión nos indica la influencia que puede ejercer el componente aleatorio de la respuesta instrumental sobre la calidad de la recta de regresión, por

lo que para su evaluación se requiere la repetición de análisis de los patrones. Se pueden definir dos parámetros diferentes indicativos ambos de la precisión del método:

1. *Reproducibilidad o precisión interlaboratorios*: que es la concordancia entre los resultados del análisis de una misma muestra realizados por diferentes laboratorios.
2. *Repetibilidad o precisión intralaboratorio*: que es la concordancia entre los resultados del análisis de una misma muestra, realizados por un mismo operador, aplicando el mismo método y en el mismo laboratorio.

En la presente Memoria la precisión se evaluó como precisión intralaboratorios de las dos formas siguientes:

1. *Repetibilidad del método propuesto aplicado a una muestra patrón y al blanco*: Se preparan 10 muestras patrón idénticas, de concentración correspondiente a un punto central de la recta de calibrado y 10 blancos y se calcula la desviación estándar relativa (DER) de ambas series de la siguiente forma:

$$DNR(\%) = \frac{s_{n-1}}{\bar{R}} 100 \quad (\text{Ec. 1.18})$$

donde: s_{n-1} es la desviación estándar a través de las respuestas de fosforescencia encontradas y \bar{R} es la media de las respuesta de las 10 medidas de los patrones en un caso y de los 10 blancos en el otro.

2. *Repetibilidad del método a partir de los datos del calibrado*: se calculó la precisión como la desviación estándar relativa de la concentración DER(C) utilizando la siguiente expresión:

$$DNR(C) = \frac{s_c}{C} 100(\%) \quad (\text{Ec. 1.19})$$

donde s_C es la desviación estándar de las concentraciones del calibrado que viene dada por la ecuación 1.10.

Exactitud. La exactitud es el parámetro analítico que nos indica la capacidad del método analítico para dar resultados lo más próximos posibles al *valor verdadero*. Evaluar la exactitud es estimar la concentración de analito en una muestra y compararla estadísticamente con el valor considerado verdadero. Sin embargo el concepto de valor verdadero es un concepto más filosófico que real, ya que nadie puede saber si el resultado es exacto en el sentido estricto de la palabra. Para evaluar la exactitud hay que establecer el valor "considerado" como verdadero y para ello se puede utilizar alguno de los siguientes protocolos:

1. Empleo de un material de referencia.
2. Ejercicios interlaboratorios.
3. Comparación con una metodología estándar como referencia.

En la presente Memoria la evaluación de la exactitud, no puede realizarse por ninguno de los dos primeros protocolos porque no poseemos materiales de referencia de los analitos aquí estudiados, ni tampoco podemos disponer de otros laboratorios, de ahí que la comparación con métodos de referencia sea el protocolo utilizado para evaluar este parámetro.

Selectividad. Al hablar de la selectividad de un método analítico nos estamos refiriendo a la cualidad de este por la cual podemos conocer la influencia que las perturbaciones de origen físico o químico pueden ejercer sobre la señal analítica. En el caso de perturbaciones producidas por agentes químicos diremos que se trata de interferencias y llamaremos interferentes a las especies químicas que las originan. Según la IUPAC [11] interferente es toda sustancia que genera un error sistemáti-

co en el resultado de un procedimiento analítico, al menos para alguna concentración de analito comprendida dentro del rango de aplicación del método.

Las interferencias producidas por especies químicas, fundamentalmente se deben a dos razones: a) el interferente produce una señal que se superpone o solapa con la del analito y b) la sustancia interferente interacciona de algún modo con el analito y distorsiona la señal que este produce. En cualquiera de los casos, para saber si una especie química interfiere en un proceso de medida vamos a seguir la siguiente metodología: medir la señal producida por una determinada concentración de analito en presencia del supuesto interferente y comprobar si este valor se encuentra dentro de un intervalo de confianza previamente establecido. En esta Memoria hemos adoptado el criterio de considerar interferente a una especie química dada, a partir de un valor dado de la concentración de ese interferente, cuando al determinar la concentración de analito en presencia y en ausencia de interferente para varias réplicas de ambos, las desviaciones estándar de ambos conjuntos de medidas difieren entre sí una cantidad superior a la desviación estándar resultante de las medidas de repetitividad del mismo. Cualquier concentración de interferente que no produzca esta desviación diremos que no produce interferencias.

2.3.2 Método de calibrado por adición de patrón.

En determinadas ocasiones, especialmente las aplicaciones de los métodos propuestos para la determinación de los pesticidas en agua de mar o en suero sanguíneo como es el caso de la warfarina, es importante la aplicación de alguna de las modalidades del método de calibración univariante conocido como adición de patrón [12]. Este método se emplea frecuentemente en Química Analítica por varias razones:

1. Evitar el denominado *efecto matriz* que se presenta en la determinación de analitos en muestras en las que la matriz de la interfiere en el resultado obtenido mediante calibración con patrones externos (CS).
2. Detectar la presencia de analitos en concentraciones inferiores a los respectivos límites de cuantificación, pero superiores a su sensibilidades analíticas.
3. Comprobar la exactitud de los resultados obtenidos por el método propuesto cuando no se dispone de un método de referencia apropiado.

La aplicación de este método, en su modalidad de concentraciones crecientes de patrón para un volumen final fijo, consiste en lo siguiente: tras el tratamiento previo de la muestra se adicionan, en todos los matraces, volúmenes iguales de disolución problema y se añaden cantidades crecientes y perfectamente conocidas de disolución patrón de analito, empezando en cero y enrasando todos las matraces hasta un volumen final constante.

Medidas las correspondientes respuestas representamos las señales obtenidas frente a las concentraciones (o volúmenes) de patrón adicionadas. Se obtiene así una recta de cuya ordenada en el origen podemos deducir la concentración de analito en la muestra. En ausencia de efecto matriz, Cuadros y Col. [12] han desarrollado un protocolo estadístico adecuado para validar un método analítico aplicando este método de adición de patrón y comparando los resultados con los obtenidos mediante calibrado con patrones externos y de Youden. Esta metodología implica la realización de tres de calibrados: 1º) Calibrado con patrones, CS. 2º) Calibrado con adición de patrón, CA. 3º) Calibrado de Youden, CY. Este último consiste en obtener la recta de regresión utilizando volúmenes crecientes de muestra diluidos todos ellos hasta un mismo volumen final y representando gráficamente la señal obtenida en función del cociente $V_{\text{añadido}}/V_{\text{final}}$.

Aplicando el protocolo estadístico del análisis de regresión lineal [34], se calculan las desviaciones estándar de las regresiones, los términos independientes (a_s , a_A y a_Y), y las pendientes (b_s , b_A y b_Y) de los tres calibrados y, suponiendo que no existen interacciones analito-matriz que produzcan errores sistemáticos proporcionales y que se elimina la contribución de la matriz a la respuesta analítica, se procede como sigue:

1. Se comparan las varianzas de regresión de los calibrados CS y CA y se calcula la varianza promedio.
2. Se comparan las pendientes de los calibrados CS y CA y se calcula la pendiente promedio.
3. Se corrigen las ordenadas en el origen de los calibrados CS y CA y se estima el blanco de la matriz a partir del calibrado CY.
4. Se estima el contenido en analito en la muestra mediante los calibrados CS y CA y se comparan ambos contenidos.

Si ambos contenidos son iguales, el error sistemático constante ha sido corregido mediante el blanco de Youden y se puede utilizar el calibrado CS para la determinación de analito en esa muestra.

Los protocolos estadísticos utilizados para el cálculo de los anteriores puntos son los siguientes:

1. *Comparación de las varianzas de regresión de CS y CA y cálculo de la varianza promedio.*

Para comparar las varianzas de dos calibrados utilizaremos el test de F de Snedecor calculando el estadístico F_{cal} mediante la expresión:

$$F_{\text{cal}} = \frac{S_a^2}{S_b^2} \quad (\text{Ec. 1.20})$$

en donde s_a y s_b son las varianzas de los dos métodos a comparar, habiéndose colocado en el numerador la de mayor valor. Este valor calculado se compara con el valor tabulado F_{tab} , para el nivel de confianza elegido y con los correspondientes grados de libertad para numerador y denominador, y si $F_{\text{cal}} < F_{\text{tab}}$ se admite que no hay diferencia significativa entre ambas varianzas y se procede al cálculo de la varianza promedio mediante la expresión:

$$s_p^2 = \frac{(n_s - 2)s_s^2 + (n_A - 2)s_A^2}{n_s + n_A - 4} \quad (\text{Ec. 1.21})$$

donde: n_s es el número de parejas de datos del calibrado con patrones (CS), n_A es el número de parejas de datos del calibrado mediante adición de patrón (CA), s_s y s_A son las desviaciones estándar de los calibrados CS y CA respectivamente y s_p la desviación estándar promedio.

Cuando no hay homogeneidad en las varianzas se utilizará el valor más pequeño de la desviación estándar de regresión (s_s ó s_A) para calcular el intervalo de confianza de a_s y para la comparación de los contenidos en analito.

2. Comparación de la igualdad de pendientes.

Se utiliza el estadístico t de Student con $(n_s + n_A - 4)$ grados de libertad y se acepta como hipótesis nula la homogeneidad entre pendientes, para un nivel de significación dado ($>1\%$), si $t_{\text{cal}} < t_{\text{tab}}$. El t_{cal} viene dado por la siguiente ecuación:

$$t(b) = \frac{|b_s - b_A|}{s_p \sqrt{\frac{1}{\sum (c_{i,S} - \bar{c}_S)^2} + \frac{1}{\sum (c_{i,A} - \bar{c}_A)^2}}} \quad (\text{Ec. 1.22})$$

donde: b_s y b_A son las pendientes de los calibrados CS y CA respectivamente y el resto de variables tienen los significados ya conocidos.

Si las pendientes no son similares, existe un componente de error proporcional que podemos minimizar aumentando el tamaño de las adiciones [13] y comparando las nuevas pendientes.

Si las pendientes son similares tomaremos la pendiente del calibrado CS como representativa de ambos calibrados CS y CA, o bien, para una estimación más rigurosa, tomaríamos la pendiente media dada por la ecuación:

$$b_p = \frac{\sum (C_i - \bar{C})_s (R_i - \bar{R})_s + \sum (C_i - \bar{C})_A (R_i - \bar{R})_A}{\sum (C_i - \bar{C})_s^2 + \sum (C_i - \bar{C})_A^2} \quad (\text{Ec. 1.23})$$

3. *Calculo de las nuevas ordenadas en el origen.*

A partir de la pendiente promedio b_p se calcula el nuevo valor del término independientes del calibrado de adición de patrón mediante la siguiente ecuación:

$$a'_A = \bar{R}_A - b_p \bar{C}_s \quad (\text{Ec. 1.24})$$

si no hay diferencia significativa entre los términos a_s y a_Y . Esta comparación, puesto que ambos valores se obtienen a partir de diferentes variables independientes, no se puede llevar a cabo mediante un test de comparación y la diferencia significativa entre ambas la estableceremos comprobando si el valor de a_Y se encuentra dentro del intervalo de confianza de a'_s para un nivel de significación del 1% y (n_s-2) grados de libertad, o sea,

$$a_Y \in a'_s \pm t_{\alpha} s_s \sqrt{\frac{\sum C_{i,s}^2}{n \sum (C_{i,s} - \bar{C}_s)^2}} \quad (\text{Ec. 1.25})$$

si a_Y no está incluido en el intervalo de confianza de a'_s , como blanco de la muestra se tomará el blanco de Youden:

$$Y_b = a_Y - a'_s \quad (\text{Ec. 1.26})$$

4. Comparación de la exactitud de los resultados analíticos.

Finalmente se comprueba la exactitud del método analítico por una de las dos formas siguientes:

A) Comparando los resultados analíticos obtenidos al analizar una muestra de ensayo por los métodos CS y CA. Para comparar las concentraciones encontradas se utiliza el estadístico t de comparación de dos medias, para un nivel de significación del 5% y con $(n_s + n_A - 3)$ grados de libertad. El contenido analítico en la disolución calculado a partir de la recta de calibrado de patrones $C_{x,s}$ y el calculado mediante la recta de calibrado por adición de patrón $C_{x,A}$, se obtienen mediante las siguientes ecuaciones:

$$C_{x,s} = \frac{R_x - a_Y}{b_p} \quad \text{y} \quad C_{x,A} = \frac{a'_A - a_Y}{b_p} \quad (\text{Ec. 1.27})$$

El estadístico t de comparación de las concentraciones $C_{x,s}$ y $C_{x,A}$ está dado por la expresión:

$$t = \frac{|C_{x,s} - C_{x,A}|}{\frac{s_p}{b_p} \sqrt{\frac{1}{n_s} + \frac{1}{n_A}}} \quad (\text{Ec. 1.28})$$

Si $t_{\text{cal}} \geq t_{\text{tab}}$ los resultados no son iguales y el método no es exacto.

Si $t_{\text{cal}} \leq t_{\text{tab}}$ los resultados obtenidos son iguales y el método es exacto.

B) Comparando las medias de dos conjuntos de resultados: los obtenidos con nuestro método y los resultados obtenidos mediante un método de referencia. En ambos casos, obviamente, se utiliza la misma muestra.

La primera etapa empieza por la comparación de las varianzas de los conjuntos de datos mediante el test de la F de Fischer, que viene dado por la siguiente expresión:

$$F_{\text{cal}} = \frac{s_M^2}{s_m^2} \quad (\text{Ec. 1.29})$$

donde s_M^2 y s_m^2 son las varianzas de ambos conjuntos de datos. La mayor de ellas se coloca siempre en el numerador y el valor calculado (F_{cal}) se compara con el valor tabulado (F_{tab}) para un nivel de significación α , con $n_{\text{Ref}} - 1$ y $n_r - 1$ grados de libertad para el método de referencia y nuestro método respectivamente. Al efectuar la comparación se nos pueden presentar dos casos:

1. Si $F_{\text{cal}} > F_{\text{tab}}$ significa que hay una deferencia significativa entre las varianzas de los dos conjuntos de datos, en cuyo caso se coparan las medias de los dos conjuntos de datos aplicando el test de la t de Student:

$$t_{\text{cal}} = \frac{|C_{\text{Ref}} - C_r|}{\sqrt{\frac{s_{\text{Ref}}^2}{n_{\text{Ref}}} + \frac{s_r^2}{n_r}}} \quad (\text{Ec. 1.30})$$

se compara t_{cal} con el valor de t_{tab} para un grado de confianza $\alpha = 0.05$ y unos grados de libertad aproximados que se puede calcular por el test de Welch, de la siguiente forma:

$$g.l. = \frac{\left(\frac{s_{\text{Ref}}^2}{n_{\text{Ref}}} + \frac{s_r^2}{n_r}\right)^2}{\frac{\left(\frac{s_{\text{Ref}}^2}{n_{\text{Ref}}}\right)^2}{n_{\text{Ref}}} + \frac{\left(\frac{s_r^2}{n_r}\right)^2}{n_r - 1}} \quad (\text{Ec. 1.31})$$

donde: r es el subíndice indicativo de nuestro método y Ref el del método de referencia.

2. Si $F_{\text{cal}} < F_{\text{tab}}$ no hay diferencia significativa entre las varianzas de los conjuntos de datos y el segundo paso será el cálculo de la varianza promedio (s_p^2) de las varianzas correspondiente a ambos conjuntos de datos, dada por la expresión:

$$s_p^2 = \frac{(n_{\text{Ref}} - 1)s_{\text{Ref}}^2 + (n_r - 1)s_r^2}{(n_{\text{Ref}} + n_r - 2)} \quad (\text{Ec. 1.32})$$

El tercer paso se calcula el valor de t_{cal} mediante la siguiente ecuación:

$$t_{\text{cal}} = \frac{|\bar{C}_{\text{Ref}} - \bar{C}_r|}{\sqrt{s_p^2 \left(\frac{1}{n_{\text{Ref}}} + \frac{1}{n_r} \right)}} \quad (\text{Ec. 1.33})$$

el valor obtenido (t_{cal}) se compara con el valor tabulado (t_{tab}) para un grado de confianza α y $(n_{\text{Ref}} + n_r - 2)$ grados de libertad.

Si $t_{\text{cal}} < t_{\text{tab}}$, se acepta que no existen diferencias significativas entre las medias de ambos conjuntos de datos \bar{C}_{Ref} y \bar{C}_r por lo que el método aplicado es exacto. En caso contrario, $t_{\text{cal}} > t_{\text{tab}}$, ambas medias son significativamente distintas y el método no es exacto.

2.4 Modelos de calibración multivariante.

Los modelos de calibración univariante que hemos estudiado anteriormente son de gran utilidad en el análisis de muestras en las que sólo hay que determinar uno de sus componentes, o varios de ellos si las señales analíticas que estos producen no interfieren entre sí. Sin embargo, los problemas analíticos que la sociedad actual plantea son cada vez más complejos, no solo por el número de especies químicas a determinar sino también por la complejidad de las matrices en las que se encuentran. Las soluciones que tradicionalmente ha propuesto la Química

Analítica para resolver estos complejos problemas han sido dos: efectuar una separación previa de los componentes, bien física o bien química, antes de proceder a su determinación o bien, operar en unas condiciones experimentales estrictas utilizando técnicas analíticas de gran selectividad y/o llevando a cabo una manipulación de la señal analítica obtenida utilizando espectros derivados, sincrónicos, etc.

Las separaciones pueden llevarse a cabo mediante procesos físicos tales como extracción, cromatografía, volatilización, etc., o bien, por procesos químicos tales como precipitación, enmascaramiento, etc., que, en ocasiones, suelen ser tedioso y, en otras, no posibles. En el caso de utilizar condiciones experimentales estrictas se obtienen fácilmente buenos resultados pero desgraciadamente no siempre es posible su aplicación.

Esta limitación se puede superar mediante la utilización de métodos instrumentales que permitan obtener los datos experimentales en función de dos o más variables controladas obteniéndose así señales multivariantes que nos pueden resolver el problemas de la determinación simultánea de varios de los componentes de una muestra y/o eliminar las posibles interferencias producidas por los concomitantes de la matriz de la muestra. Evidentemente estas series de datos multivariantes exigen un tratamiento de calibración diferente al que hemos visto hasta el momento presente.

La moderna instrumentación analítica permite obtener, en un corto intervalo de tiempo, una gran cantidad de información experimental que podemos disponer en forma de tablas de datos en función de dos o más variables, señales multivariantes. Como ejemplos de este tipo de instrumentación analítica podemos citar las técnicas acopladas, cromatografía líquida con detector de diodos en fila o cro-

matografía de gases con detector de masas o, simplemente, espectrofotómetros que permiten obtener espectros a determinados intervalos de longitud de onda.

Cuando existen más de un analito en la muestra, utilizar un sólo valor de la señal analítica supone la pérdida de gran cantidad de la información obtenida, información que no se perdería realizando un tratamiento global de la misma. Se puede obtener más información sobre la muestra si estos datos obtenidos son tratados mediante apropiados métodos de análisis multivariante.

En bibliografía podemos ver que se han propuesto distintos procedimientos de calibración multivariante [14-33] que se diferencian entre sí en los requisitos del modelo al aplicarlo y en las exigencias del cálculo implicado en el proceso de calibración. Todos ellos se basan en desarrollos matemático-estadísticos, generalmente de gran complejidad, que permiten obtener información química selectiva, a partir de datos que no son selectivos, sin necesidad de recurrir a las separaciones y tratamientos previos de la muestra que anteriormente hemos mencionado.

Como se ha indicado, existen varios modelos de calibración multivariante que se pueden clasificar de acuerdo con diferentes criterios, resultando así los siguientes grupos:

- Modelo lineal/no lineal: dependiendo de que el tipo de función matemática que relaciona las variables y los objetos sea una función lineal o no.
- Modelo de espectro completo/con selección: según se utilicen todas las variables posibles o sólo una parte seleccionada de ellas.
- Modelo clásico/inverso: en una calibración mediante un modelo clásico se define la señal analítica en función de la concentración, mientras que con un modelo inverso la función se establece al contrario.

- Modelo rígido/flexible: los modelos rígidos son aquellos que sólo se cumplen cuando se cumplen todas y cada una de las condiciones previamente establecidas por el modelo, cosa que no necesariamente ocurre en los flexibles.
- Modelo directo/inverso. Diremos que un modelo de calibración multivariante es directo cuando se conocen *a priori* los parámetros del modelo, por ejemplo, en el caso de utilizar la espectrofotometría de absorción como técnica analítica el modelo es directo si se conocen de antemano las absorptividades molares de los componentes puros. Por el contrario, un modelo es inverso cuando los parámetros del modelo se estiman a partir de mezclas de componentes de composiciones conocidas.

El modelo de calibración multivariante más simple es el modelo de regresión lineal a múltiples longitudes de onda (MLRA) que permite cuantificar dos componentes usando los espectros de ambos componentes (A y B) cuando están puros. En efecto, si dividimos el espectro de la mezcla (E_{A+B}) por el de uno de los componentes puro (E_A) y representamos este cociente (E_{A+B}/E_A) frente al coeficiente que resulta para el otro componente (E_B/E_A), obtendremos una línea recta de cuya ordenada en el origen podemos deducir la concentración del componente por el que se ha dividido (A) y de cuya pendiente se obtiene la concentración del otro componente (B).

Este modelo, así como su variante conocida como método de la derivada de espectros, son modelos lineales, rígidos, clásicos, directos y de espectro completo que sólo sirven para mezclas de dos componentes, en los que se han de cumplir varias condiciones previas: que las señales producidas por los diferentes componentes sean aditivas, que no existan interacciones entre los analitos, o entre alguno de ellos y la matriz, que afecten a la señal analítica y que no exista un gran

solapamiento de las señales producidas por los componentes. Si no se cumplen estas circunstancias, la resolución del problema exige otro tipo de modelo de calibración multivariante.

Uno de los modelos más usados es el de *regresión lineal múltiple* (MLR) en el cual, al igual que en los casos anteriores de MLRA y de su variante de la derivada de espectros, se utilizan los espectros de los componentes puros para predecir las concentraciones de los componentes en la muestra. En este caso, los valores de las concentraciones de los componentes se obtienen mediante una regresión por mínimos cuadrados que minimiza la suma de los cuadrados de los residuales que, en este caso, serán las diferencias entre las señales analíticas medidas experimentalmente y las calculadas mediante el modelo.

El fundamento es el siguiente: si en una muestra tenemos n componentes que contribuyen a la señal analítica (por ejemplo, la intensidad de fosforescencia I) al obtener su espectro para un intervalo dado de longitudes de onda, para cada longitud de onda registrada (j), basándonos en la ecuación I.1 y suponiendo la aditividad de señales, la ausencia de interacciones entre los analitos o de estos con la matriz y que los espectros de fosforescencia no están excesivamente solapados, se debe cumplir la siguiente ecuación:

$$I_j = B_{j,1} \cdot C_1 + B_{j,2} \cdot C_2 + B_{j,3} \cdot C_3 + \dots + B_{j,n} \cdot C_n$$

En donde los términos $B_{j,i} \cdot C_i$ son las contribuciones de todos y cada uno de los componentes de la muestra al valor de la señal medida, para una longitud de onda cualquiera (j) de las m longitudes de onda que componen el espectro registrado. Escribiendo una ecuación como la anterior para cada una de las longitudes de onda registradas, obtendremos una serie de ecuaciones tales como:

$$I_1 = B_{1,1} \cdot C_1 + B_{1,2} \cdot C_2 + B_{1,3} \cdot C_3 + \dots + B_{1,n} \cdot C_n$$

$$I_i = B_{i,1} \cdot C_1 + B_{i,2} \cdot C_2 + B_{i,3} \cdot C_3 + \dots + B_{i,n} \cdot C_n$$

$$I_m = B_{m,1} \cdot C_1 + B_{m,2} \cdot C_2 + B_{m,3} \cdot C_3 + \dots + B_{m,n} \cdot C_n$$

Sistema de ecuaciones que lo podemos expresar en forma matricial de la siguiente forma:

$$\mathbf{I} = \mathbf{B} \mathbf{C}$$

siendo **I** la matriz de las señales medidas (intensidad de fosforescencia en nuestro ejemplo), **C** la de las concentraciones y **B** la de los coeficientes $B_{i,j}$. En estas condiciones los valores de **B** en cada columna de la matriz serán las intensidades de fosforescencia del componente puro correspondiente a esa columna divididas por su concentración, para las diferentes longitudes de onda del espectro registrado. Por lo tanto, estos valores de **B** se pueden obtener a partir de los espectros de los componentes puros, registrados para las mismas longitudes de onda utilizadas para la mezcla, siempre que se cumplan las siguientes condiciones:

- Se conocen todos los componentes de la muestra que contribuyen a la señal analítica, incluidos los interferentes.
- No existen interacciones físicas ni químicas entre los analitos o entre ellos y la matriz analítica.
- Las señales analíticas producidas por los distintos componentes de la muestra son aditivas.

A la matriz **B** se le suele añadir una primera columna formada por unos si se quiere tener en cuenta la ordenada en el origen del ajuste.

Obtenida la matriz **B** a partir de los espectros de los componentes puros, el cálculo de los componentes presentes en la muestra se efectúa mediante una regre-

sión por mínimos cuadrados en la que se admite que el mejor ajuste es aquel para el cual la suma de los cuadrados de los residuales es mínima con lo cual las concentraciones se pueden calcular a partir de la siguiente expresión matricial:

$$\hat{\mathbf{C}} = (\mathbf{B}^T \mathbf{B})^{-1} \mathbf{B}^T \mathbf{I}$$

en donde $\hat{\mathbf{C}}$ es la matriz de concentraciones calculadas y \mathbf{B}^T es la matriz traspuesta de \mathbf{B} , siendo \mathbf{I} la matriz de las medidas experimentales de la muestra.

Del estudio de los residuales podemos obtener información acerca de la bondad de los cálculos realizados ya que un valor alto de los residuales nos pone de manifiesto si hay errores en la manipulación de muestra y patrones, o si el modelo elegido no es el correcto ya que, representando los residuales frente a longitudes de onda, podemos obtener una distribución de estos alrededor de cero (primer caso) o bien, se puede observar una tendencia clara de comportamiento de estos si es que el modelo elegido no es el correcto [35].

Los principales inconvenientes que presenta este modelo son: 1º) se trata de un modelo rígido en el que han de cumplirse las condiciones previas establecidas que hemos indicado anteriormente, 2º) si se utiliza el espectro completo, los cálculos pueden ser muy complicados porque se generan matrices de un gran número de filas 3º) si se eligen intervalos de longitudes de onda (modelo de selección) la elección ha de hacerse con unos criterios que impidan la colinealidad de las columnas de la matriz, cosa que no es fácil cuando las señales medidas presentan un determinado solapamiento.

Para evitar, al menos en parte, algunos de estos inconvenientes se han propuesto otros modelos de calibración multivariante, entre los que cabe destacar los conocidos como: mínimos cuadrados clásicos (CLS) y mínimos cuadrados inversos (ILS) que vamos a reseñar muy brevemente.

En estos modelos la matriz de calibración no se obtiene a partir de los espectros de los componentes puros, sino a partir de disoluciones que contienen mezclas de los componentes puros, en las que las concentraciones de estos abarcan rangos de concentraciones dentro de los cuales se espera que estén incluidas las concentraciones de los analitos que se encuentran en la muestra. Estos patrones son de composición conocida y se registran sus espectros bajo las mismas condiciones experimentales con las que se registrará el espectro de la muestra.

Una vez registrados estos espectros de las disoluciones de patrones disponemos de dos conjuntos de datos que podemos escribir en forma matricial: la matriz de las respuestas (**I**) (espectros de intensidades de fosforescencia en nuestro caso) y la matriz de las concentraciones (**C**) que contiene las concentraciones de los diferentes componentes en las distintas disoluciones patrón utilizadas. Ahora se trata de buscar la relación existente entre estas dos matrices **I** y **C** que será una nueva matriz **B** a la que llamaremos matriz de calibrado. Haciendo una comparación de este modelo de calibración con la calibración univariante, podemos decir que la obtención de la matriz de calibrado equivale a la obtención de la curva de calibrado, o sea, es la etapa de calibración.

En el caso del modelo CLS, una vez obtenidos los datos experimentales con las disoluciones patrón, la matriz de calibración se obtiene partiendo de la expresión

$$\mathbf{I} = \mathbf{B} \cdot \mathbf{C} + \mathbf{r}_I$$

donde cada letra tiene el significado que ya conocemos y \mathbf{r}_I es la matriz de los residuales de **I** que serán las diferencias entre los valores experimentales de **I** y los respectivos valores calculados por el modelo. La solución que aporta el mejor ajuste

será aquella para la cual la suma de los cuadrados de estos residuales sea mínima, siendo entonces:

$$\mathbf{B} = (\mathbf{C}^T \mathbf{C})^{-1} \mathbf{C}^T \mathbf{I}$$

Una vez obtenido el valor de la matriz \mathbf{B} el cálculo de las concentraciones, o sea, la etapa de predicción, se lleva a cabo mediante la expresión:

$$\mathbf{C}_x = (\mathbf{B}^T \mathbf{B})^{-1} \mathbf{B}^T \mathbf{I}_x$$

donde \mathbf{I}_x es el espectro de la muestra que queremos analizar, siendo \mathbf{C}_x las concentraciones de los diferentes analitos en dicha muestra.

El modelo ILS tiene el mismo fundamento matemático que el CLS pero en este caso se trata de un modelo inverso, es decir, en lugar de expresar la señal en función de las concentraciones de los analitos, se utiliza como expresión de partida la siguiente:

$$\mathbf{C} = \mathbf{I}\mathbf{P} + \mathbf{r}_c$$

En donde \mathbf{I} y \mathbf{C} tienen los significados que conocemos, \mathbf{r}_c son ahora los residuales de las concentraciones, no de las señales analíticas como en el caso anterior y \mathbf{P} será la matriz de los coeficientes que expresan las concentraciones en función de las señales analíticas. Por tanto, en este caso, la matriz de calibración que se obtendrá durante la etapa de calibración vendrá dada por la expresión:

$$\mathbf{P} = (\mathbf{I}^T \mathbf{I})^{-1} \mathbf{I}^T \mathbf{C}$$

y la matriz de concentraciones, en la etapa de predicción, se calculará mediante la expresión:

$$\mathbf{C}_x = \mathbf{P}\mathbf{I}_x$$

siendo \mathbf{I}_x y \mathbf{C}_x las matrices correspondientes a señales analíticas y concentraciones en la muestra que queremos analizar. Este modelo es una buena aproximación para el análisis cuantitativo de multicomponentes ya que la matriz \mathbf{P} se puede obtener

conociendo sólo las concentraciones de los componentes que nos interesan porque el propio proceso de calibración modela el resto de los componentes que no interesan en el análisis. Su principal inconveniente radica en que el número de longitudes de onda seleccionadas no puede exceder al de muestras utilizado para obtener la matriz de calibración y si se aumenta el número de muestras aparecen problemas de colinealidad.

Con el fin de aprovechar las ventajas que presentan los modelos anteriores, es decir, uso del espectro completo, como es el caso del modelo CLS, y uso de los componentes que interesan sin tener en cuenta el resto de componentes de la muestra, se han propuesto modelos de calibración multivariante, que podemos considerar como híbridos de los anteriores ya que combinan ventajas de ambos sin tener sus limitaciones. En estos modelos se hace uso del análisis de componentes principales (PAC) como forma de obtener información química a partir de la matriz de calibración, considerando para ello sólo aquellos componentes que son significativos en el sistema. Estos nuevos modelos a los que nos referimos son los modelos de regresión de componentes principales (PCR) y mínimos cuadrados parciales (PLS) este último en sus dos vertientes PLS-1 y PLS-2.

En estos modelos, como en los anteriores, durante la etapa de calibración se trata de establecer la relación entre la matriz de las señales analíticas producidas por las disoluciones patrón que contienen los componentes en diferentes proporciones, todas ellas conocidas, y la matriz de las concentraciones que producen dichas señales. En la segunda etapa se tratará de estimar las concentraciones de los distintos analitos presentes en la muestra, usando para ello la matriz de calibración obtenida en la etapa anterior. La diferencia con los modelos anteriores consiste en que, en este caso, la matriz de las señales analíticas (\mathbf{I}) se descompone en una suma

de h factores, siendo h menor o igual que el número de longitudes de onda utilizadas en los espectros, mediante el método de análisis de componentes principales. De esta forma durante la etapa de calibración, la matriz \mathbf{I} queda descompuesta como sigue:

$$\mathbf{I} = \mathbf{T}\mathbf{D} + \mathbf{r}_1$$

$$\mathbf{C} = \mathbf{T}\mathbf{q} + \mathbf{r}_2$$

en donde la nueva matriz \mathbf{D} expresa el nuevo sistema de coordenadas al que se van a referir los espectros (matriz de “loading”), \mathbf{T} es la matriz de intensidades en este nuevo sistema de coordenadas o matriz de “scores” y \mathbf{r}_1 es la matriz de residuales correspondiente a las señales analíticas cuando se utilizan h factores. \mathbf{q} es el vector que relaciona las intensidades espectrales \mathbf{T} en el nuevo sistema de coordenadas con las concentraciones de los analitos en cada una de las disoluciones patrón \mathbf{C} .

El proceso seguido en el método PLS para determinar la matriz \mathbf{D} es utilizar simultáneamente la información contenida en la matriz \mathbf{I} y la contenida en la matriz de concentraciones \mathbf{C} . El procedimiento consiste en seguir una serie de etapas o pasos de ajuste parcial de las matrices \mathbf{I} y \mathbf{C} mediante regresión y obtención de los parámetros \mathbf{D} , \mathbf{T} y \mathbf{q} . Dicho de otra forma en PLS la descomposición espectral de \mathbf{I} usa la información de concentraciones y ello hace que los espectros que contienen mayores concentraciones aporten más al modelo que los que tienen baja concentración.

El algoritmo PLS tiene dos versiones: PLS-1 y PLS-2. La versión PLS-2 realiza la calibración de todos los componentes a la vez con lo cual resulta un conjunto de *scores* y otro de vectores *loading* para toda la calibración mientras que el PLS-1 calcula el conjunto de *scores* y el de vectores *loading* por separado para cada componente de interés. Esta calibración para cada componente por separado

implica una mejor precisión en la etapa de predicción pero, paralelamente también implica un cálculo más lento y tedioso, factor a tener en cuenta cuando el número de componentes es alto.

Al optimizar el modelo durante la etapa de calibración, una de las principales dificultades del método PLS es conocer el número más adecuado de vectores *loading* necesario para modelar los datos. Si este número es alto corremos el riesgo de modular el “ruido” del sistema lo cual influye negativamente en las predicciones que posteriormente hemos de hacer con él. Si, por el contrario, el número de vectores es menor del correcto, estamos utilizando un número insuficiente de términos para modelar todas las variaciones espectrales de los componentes de interés y esto repercute en la bondad del modelo. En consecuencia es necesario determinar este número de vectores *loading* que permite una modelación idónea.

Por razones obvias este número debe ser menor que el número de longitudes de onda utilizadas en el rango de trabajo y debe coincidir con el de causas reales que produzcan variación en la matriz original de calibración. Para efectuar el cálculo de este número se han propuesto varias técnicas de las que la más usada es la de validación cruzada (*cross-validation*) [36, 37] que es la que seguiremos en esta Memoria. El proceso que se sigue consta de los siguientes pasos:

- Tomando todas las disoluciones patrón empleadas para la calibración menos una de ellas, se efectúa la descomposición espectral para un factor y se calcula la matriz de calibración mediante regresión.
- Con la matriz obtenida se predice la concentración de la disolución patrón que no se tomó para su cálculo.

- La diferencia entre las concentraciones calculada y la que realmente tenía el patrón, se eleva al cuadrado y se calcula el PRESS (suma de los cuadrados de los errores residuales pronosticados)

$$\text{PRESS} = \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^M (\hat{C}_i - C_i)^2$$

donde N es el número total de muestras empleadas en la calibración; M es el número total de analitos; \hat{C}_i es la concentración calculada con la matriz y C_i es la real del patrón. Hay que advertir que en lugar del parámetro PRESS se pueden utilizar otros parámetros estadísticos tales como el error estándar de predicción definido como $(\text{PRESS}/N-1)^2$ o el error total que viene dado por la

expresión: $\left[\sum_{i=1}^N (\hat{C}_i - C_i) \right]^{0.5}$.

- A continuación se repite el proceso incluyendo ahora la disolución patrón que se había dejado fuera anteriormente y dejando fuera otra disolución.
- Terminado el proceso anterior con todas las disoluciones patrón, se vuelve a repetir la operación dejando fuera dos disoluciones en cada caso y efectuando los cálculos oportunos. Posteriormente se hace con tres y así sucesivamente hasta que el parámetro estadístico (PRESS en nuestro caso) sea el más adecuado para determinar el número óptimo de factores a tener en cuenta, lo cual se consigue mediante la aplicación del criterio de Haaland y Thomas [38] que consiste en lo siguiente: de todos los valores de PRESS se selecciona el menor de ellos (modelo que supone h factores) y se comparan con él los valores de PRESS obtenidos con menos de h factores. Se selecciona como óptimo el modelo (de h' factores) cuyo PRESS no es significativamente mayor que el de PRESS mínimo, utilizando para ello el estadístico-F de manera que $F(h) =$

[PRESS (h)/PRESS (h')] para $h = 1, 2, 3, \dots, h'$. Se elige como número óptimo de factores el que cumple la condición $F(h) < F_{\alpha, m, m}$ en donde $F_{\alpha, m, m}$ es el $(1-\alpha)$ por ciento de la distribución de Snedecor con m' grados de libertad y m muestras de calibración. Haaland y Thomas proponen un valor de 0,75 para $1-\alpha$, valor este calculado empíricamente, con lo cual el número óptimo de factores es aquel que corresponde al primer valor de PRESS cuya F es menor que 0,75.

Obtenido el modelo podemos proceder a determinar el grado de ajuste entre los valores calculados por el modelo y los valores teóricos, mediante parámetros estadísticos como la desviación estándar media de los residuales RMSD, definida como:

$$\text{RMSD} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (\hat{c}_i - c_i)^2}{N}}$$

que es una estimación del error absoluto en la predicción de cada uno de los componentes, o bien mediante el error relativo de predicción que se define mediante la expresión:

$$\text{REP} = \frac{100}{\bar{C}} \left[\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (\hat{c}_i - c_i)^2 \right]^{0,5}$$

que también expresa la capacidad de predicción del método para cada componente en valor relativo.

Establecido el modelo y su capacidad de predicción comenzamos la segunda etapa del proceso de calibrado, o sea, la etapa de predicción. En esta etapa las expresiones matriciales usadas son:

$$\mathbf{I}_x = \mathbf{t}_x \mathbf{D}$$

$$\mathbf{C}_x = \mathbf{t}_x \mathbf{q}$$

Donde los subíndices x indican que se trata de las matrices o valores correspondientes a la muestra a analizar.

En esta etapa primero se determina el valor del vector de *scores* t_x correspondiente al espectro a_x de la muestra problema proyectando este sobre el nuevo espacio vectorial definido por la matriz de *loading* P calculada en la etapa precedente. Tras conocer dicho vector se proyecta este sobre el vector q correspondiente a las concentraciones de los analitos y se obtiene finalmente la concentración de los mismos en la muestra problema.

3. MEDIOS MATERIALES

En esta parte del capítulo vamos a exponer los medios materiales de los que hicimos uso para llevar a cabo el trabajo experimental descrito en la presente Memoria. Para mayor claridad los vamos a dividir en los siguientes grupos:

- Instrumentación y materiales de laboratorio.
- Reactivos y disoluciones empleados.
- Soportes sólidos ensayados.
- Material y programas informáticos.

3.1. Instrumentación y material de laboratorio.

- Espectrofluorímetro Perkin-Elmer LS-50 provisto de:
 - Lámpara de descarga modulada de xenón con pulso equivalente a 20 kW durante 8 μ S.
 - Monocromadores Monk-Gillieson F/3, cuyos intervalos de longitud de onda son:
 - Monocromador de excitación: 200 a 800 nm.

- Monocromador de emisión: 200 a 900 nm.
- Fotomultiplicador Hamamatsu R289.
- Curva de corrección de rodamina que está almacenada para corregir la respuesta del fotomultiplicador de referencia.

Para asegurar la reproducibilidad de las medidas, el espectrofluorímetro fue chequeado diariamente en modo fosforescencia, empleando un patrón P1 que contiene tenoiltrifluoroacetato de europio (III) disuelto en una matriz sólida transparente de poli(metilmetacrilato), en forma de prisma rectangular de dimensiones 45x12,5x12,5 mm suministrado por Perkin-Elmer. Este patrón emite una intensidad de fosforescencia relativa de 430,6 unidades a $\lambda_{em} = 614$ nm y $\lambda_{ex} = 340$ nm, empleando rendijas de excitación y emisión de 5 nm, un factor $t_g = 0,1$ ms, $t_d = 1$ ms y registrando la señal de emisión fosforescente en el rango de longitudes de onda comprendido entre 550 y 650 nm.

- Cromatógrafo líquido de alta resolución Hewlett-Packard modelo 1090 equipado con: ordenador personal Pentium 200 y el programa informático ChemStation HPLC^{3D} (Win95), columna Nucleosil MOS 5 μ m 100x2,1 mm y detector de diodos en fila.
- Desionizador de agua por osmosis inversa, Millipore: Milli-Ro 12 plus y Milli-Q.
- Placa agitadora de múltiples posiciones SBS modelo A-13.
- Balanza analítica Mettler AE 163.
- Balanza granatario Mettler PJ 360 Delta-Range.
- pH-metro digital Crison modelo 517 provisto de un electrodo combinado de vidrio y calomelanos saturado.

- Baño de ultrasonidos Selecta.
- Cronómetro Hanhart.
- Centrífuga BHG, Fixette II.
- Termostato-criostato Braun-Melsungen Frigomix.
- Lámpara de IR de 250 W.
- Rotavapor Heidolph VVI. 40-200 rpm.
- Bomba de vacío Büchi, modelo B-169 de laboratorios Umos-Technik.
- Secador de pelo Braun Selencio 1600 (con potencia máxima 2000 W)
- Láminas rectangulares de cuarzo (45x12x1 mm) Hellma Suprasil.
- Micropipeta Biohit Proline (0,5-10 μ L).
- Matraces aforados Afora clase A de distintos volúmenes.
- Pipetas aforadas y graduadas Afora clase A de distintas capacidades.
- Goteros, vasos de precipitado, pesasustancias, así como material de vidrio habitual en cualquier laboratorio analítico.

El mantenimiento del material del vidrio se hizo enjuagando varias veces con abundante agua desionizada, o bien, en los casos en que fuera necesario, lavamos previamente con una disolución de $\text{H}_2\text{O}/\text{HNO}_3$ (1:1) enjuagando posteriormente con agua destilada.

3.2. Reactivos y disoluciones.

Se incluyen en este apartado tanto los patrones de los pesticidas estudiados como sus disoluciones así como los disolventes, ácidos, bases y demás reactivos químicos empleados durante el desarrollo de la parte experimental.

3.2.1. Disolventes

- Étanol absoluto PANREAC para análisis.
- Metanol PANREAC para análisis.
- Diclorometano PANREAC.
- Acetato de etilo PANREAC.
- Cloroformo PANREAC.
- Tetrahidrofurano SIGMA.
- Agua desionizada obtenida en el desmineralizador reseñado anteriormente.
Resistencia <15 megahomios.

3.2.2. Patrones de pesticidas

En la siguiente tabla se recogen los patrones empleados así como algunas de sus características.

PESTICIDA	Fórmula/PM	Pureza (%)	Comercial	Solubilidad en agua		
				mg.L ⁻¹	T°C	pH
OPP	C ₁₂ H ₁₀ O/170,2	99	Merck	700,00	22	5,5
CBL	C ₁₂ H ₁₁ NO ₂ /201,2	99,9	Dr.S.E	120,00	30	7,0
MOR	C ₁₃ H ₆ N ₂ OS ₂ /234,3	99	RDH	0,26	22	5,5
BEN	C ₁₄ H ₁₈ N ₄ O ₃ /290,3	99	RDH	4,00	20	7,0
LIN	C ₆ H ₆ Cl ₆ /290,3	99	RDH	10,00	20	7,0
MCB	C ₉ H ₉ N ₃ O ₂ /191,9	99	RDH	8,00	20	7,0
CAP	C ₉ H ₉ CL ₃ NO ₂ S/300,6	99	RDH	3,30	25	7,0
TBZ	C ₁₂ H ₇ N ₃ S/201,2	99,9	Dr.S.E	3,4(%)	25	2,2
DIT	C ₁₂ H ₁₂ Br ₂ N ₂ /201,2	94	RDH	m.s	25	7,0
PAT	C ₁₂ H ₁₄ CL ₂ N ₂ 344,1	99	RDH	m.s	25	7,0
Dine	C ₁₀ H ₄ CL ₂ O ₂ /227,1	98	Dr.S.E	0,10	25	7,0
FOL	C ₉ H ₄ CL ₃ NO ₂ S/296,6	99	RDH	0,30	25	7,0
WAR	C ₁₉ H ₁₆ O ₄	99	Merck		---	

OPP: o-fenilfenol; **CBL:** carbaril; **MOR:** morestan; **BEN:** benomilo; **LIN:** lindano; **MCB:** carbendazima; **CAP:** captan; **TBZ:** tiobendazol; **DIT:** Dicuat; **PAT:** paracuat; **Dine:** diclone; **FOL:** folpet; **WAR:** warfarina.

Dr.S.E : Dr. S . Ehrenstorfer.

RDH: Riedel de Haën.

m.s: muy soluble

3.2.3. Disoluciones empleadas.

- Disolución de carbaril de 100 mg.L^{-1} que fue preparada disolviendo 0,01g de sustancia en 100 mL de etanol absoluto.
- Disolución de tiabendazol de 100 mg.L^{-1} preparada al disolver 0,01g del patrón en 100 ml de etanol absoluto.
- Disolución de warfarina de 100 mg.L^{-1} que fue preparada disolviendo 0,01g de sustancia en 100 ml etanol absoluto.
- Disolución de morestan de 100 mg.L^{-1} que fue preparada disolviendo 0,01g de sustancia en 100 mL de etanol absoluto.
- Disolución de o-fenilfenol de 100 mg.L^{-1} preparada disolviendo 0,01g de sustancia en 100 mL de etanol absoluto.
- Disoluciones de benomilo, folpet, captan, lindano, diclone, y carbendazima todas ellas preparadas mediante disolución en etanol absoluto, de la apropiada cantidad del correspondiente patrón.
- Disolución de 1-naftol de 100 mg.L^{-1} preparada disolviendo 0,01g de sustancia en 10 mL de etanol absoluto y enrasando hasta un volumen final de 100 ml con agua desionizada.
- Disoluciones reguladoras (ácido acético/acetato sódico 1M) de pH 4,08, preparado a partir de 500 ml de ácido acético (1M) y la cantidad necesaria de hidróxido sódico (1M) hasta alcanzar pH 4,08.
- Disoluciones de hidróxido sódico. Panreac.
- Ácido acético en disolución al 96% (Merck).
- Ácido clorhídrico en disolución acuosa al 35% (Panreac).

- Disoluciones de acetato de plomo (1M), nitrato de plomo (1M), acetato de plata (0,5 M), nitrato de plata (0,5 M), nitrato de talio (0,36M), y nitrato de mercurio(II).
- Disoluciones de NaCl, NaBr, y KI (2M)
- NaF (1M)

Otros reactivos

- Cloruro de polivinilo ALDRICH.
- Tributilfosfato SIGMA.
- Ftalato de dioctilo ALDRICH.
- 2-nitrofeniloctileter SIGMA.
- Tris(2-etilhexil)fosfato SIGMA.
- Bis(2-etilhexil)sebacato SIGMA.

3.2.5. Soporte sólidos ensayados

Los soportes sólidos comprobados en esta Memoria son de dos tipos: adsorbentes y cambiadores iónicos. Todos los soportes sólidos ensayados son tipos de papeles de distintas marcas comerciales, cuyas características (espesor, textura, y funcionalidad) difieren de unos a otros.

Los soportes ensayados fueron:

- Papel cromatográfico Whatman N°1, de 0,18 mm de espesor cuyo flujo lineal en el agua es de 130mm/30min.
- Papel cromatográfico Whatman N°4, de características similares al anterior.
- Papel de cambio iónico Whatman DE-81, con un espesor de 0,2mm cuyo flujo lineal en agua es 95mm/30min. Capacidad básica como cambiador anionico de $1,7 \mu\text{eq}/\text{cm}^2$

- Papel de cambio iónico Whatman PE-81, papel cambiador catiónico de grupo bi-funcional, fosfato de celulosa con un espesor de 0,23mm cuyo flujo lineal en agua es 125mm/30min. Capacidad ácida como cambiador catiónico, 18,0 $\mu\text{eq}/\text{cm}^2$
- Papel Albet N°.1305. Papel de filtro.
- Poliéster tipo Mylar (politereftalato de etileno), orientado biaxialmente, transparente, de 0,25 mm de espesor.
- Acetato de polivinilo.
- Metacrilato.

3.2.5. Ordenadores y programas informáticos

Ordenadores

- Ordenador personal **IBM MODELO 330-100DX4** directamente conectado al espectrofluorímetro.
- Ordenador personal 386 DX-40.
- Impresoras
 - Hewlett Packard Laserjet III.
 - Hewlett Packard Deskjet 550C.

Programas informáticos.

Se ha utilizado el programa FLDM (Fluorescence Data Manager) suministrado por la casa comercial Perkin-Elmer para manejo del espectrómetro. Los espectros fueron almacenados en disco flexible 3^{1/2} pulgadas para su posterior tratamiento con el programa adecuado.

Las representaciones gráficas se han llevado a cabo con los programas Surfer V 4.13 (Golden Softwar Inc. 1989), Grafer V1.75 (Golden Softwore Inc.1988) y Harvard Graphics V 2.0 Software Publishing Corporation 1991-1993. Statgraphics software package V. 6.0 manugistics Inc. USA (1992) y Alamin (García Campaña A., *Tesis Doctoral. Universidad de Granada 1995*), se emplearon para estudios estadísticos.

Como programas para texto:

- Microsoft Word para Windows 95, Copyright 1983-1995 Microsoft Corporation.

3.3. Método de contraste.

Con objeto de validar el método propuesto por nosotros para la determinación del carbaril, tiabendazol y la mezcla de ambos pesticidas, en esta Memoria hemos utilizado el método oficial de AOAC nº 991.06. En este método las muestras reales de agua son filtradas y el volumen medido (400 µL) es directamente inyectado en una columna de cromatografía líquida (LC) de fase inversa que opera por elución en gradiente. Después de la elución de la columna, los analitos son hidrolizados con NaOH a 95°. La metilamina formada durante la hidrólisis se hace reaccionar con o-ftalaldehido para formar un derivado altamente fluorescente, el cual es detectado por un detector de fluorescencia.

BIBLIOGRAFÍA

1. A. Savitzky y M. Golay, *Anal. Chem.*, 36, 1627 (1964).
2. PLSplus for Grams/386, Galactic Industries Corporation, Salem NH, USA (1993).
3. F.X. Rius. *Tratamiento estadístico de los datos analíticos(I). Principios básicos*, en *La calidad de los laboratorios analíticos*, de M. Valcárcel y A. Rios. Ed. Reverté, Barcelona, pgs. 39-69 (1995).
4. F.X. Rius, *Validación de métodos analíticos. Trazabilidad e incertidumbre*. Curso COMETT en Granada, (1994).
5. A.L. Wilson, *Talanta*, 17,21 (1970).
6. Analytical Methods Committee, *Analyst*, 119, 2363 (1994).
7. L. Cuadros, A. García y J.M. Bosque, *Anal. Lett.*, 29, 1231 (1996).
8. IUPAC, Analytical Chemistry Division, *Spectrochim Acta B*, 33B, 242 (1978).
9. J.D. Ingle Jr. *J. Chem. Ed.*, 51, 100 (1971).
10. L. Cuadros, A. García, C. Jiménez y M. Román, *Anal. Lett.*, 26, 1243 (1993).
11. IUPAC, Analytical Chemistry Division, *Pure & Applied Chem.*, 55, 553 (1983).
12. J.M. Bosque, L. Cuadros y A.M. García, *Recent Res. Devel. In Pure & Applied Anal. Chem.* 1, 115 (1998).
13. P. Campins Falcó. *Quimiometría*, Universidad Autónoma de Barcelona, pgs 37-82 (1988).
14. D.M. Haaland y R.G. Easterling, *Applied Spectroscopy*, 36, 665 (1982).
15. D.M. Haaland, R.G. Easterling y D. A. Vopicka, *Applied Spectroscopy*, 39, 73 (1985).
16. W. Lindberg y J.A. Persson, *Anal. Chem.*, 55, 643 (1983).
17. Y. Li-Shi y S.P. Levine, *Anal. Chem.*, 61, 677 (1989).

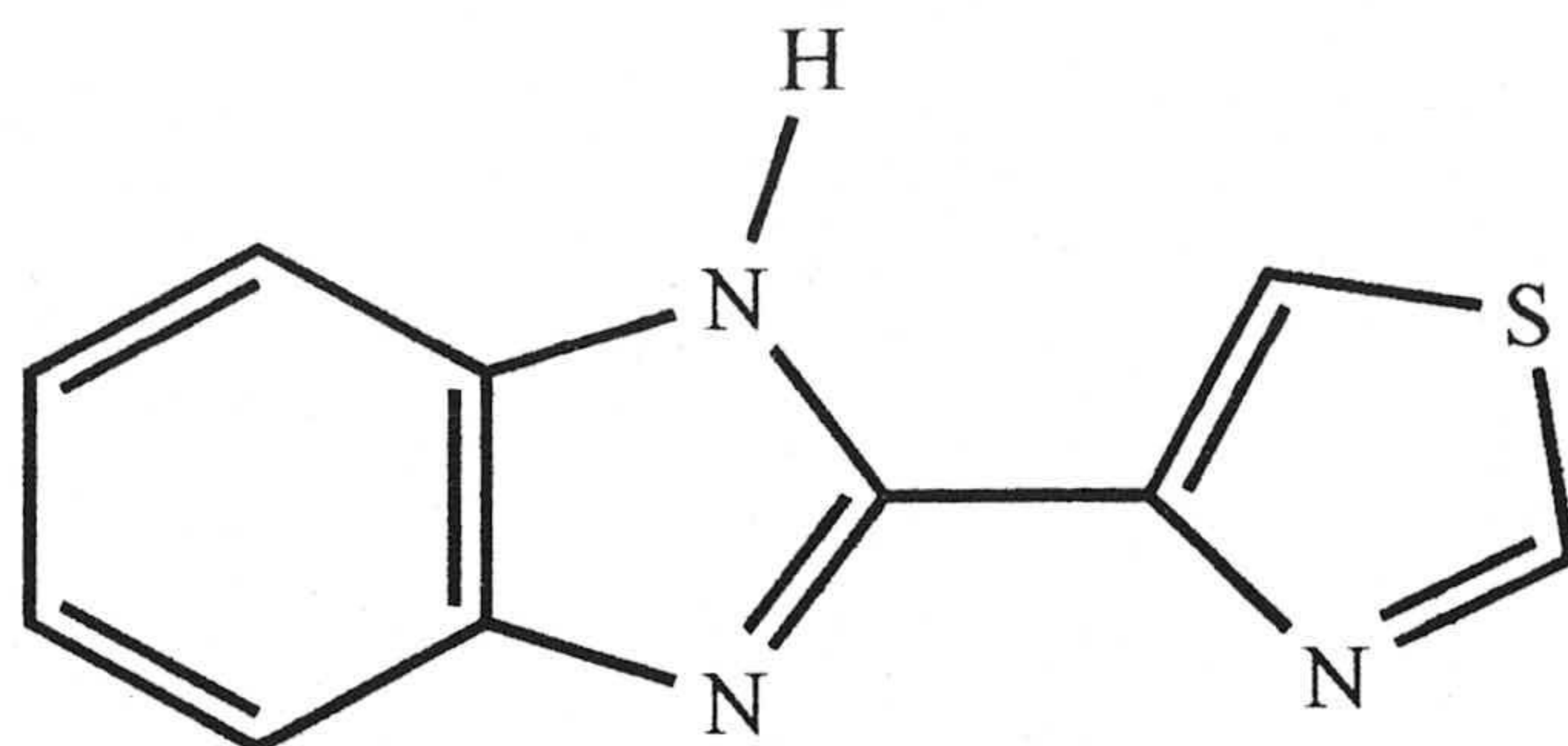
18. D.A. Whitman, M.B. Sasholtz, G.D. Christian, J Ruzicka y B.R. Kowalski *Anal. Chem.*, 63, 775 (1991).
19. P.G. Gemperline, G.R. Long y V.G. Gregoriou, *Anal. Chem.*, 63, 2313 (1991).
20. P. MacLaurin, P.J. Worsfold, P. Norman y M. Crane, *Analyst*, 118, 617 (1993).
21. B.M. Quencer y S.R. Crouch, *Analyst*, 118, 695 (1993).
22. M. Blanco, J. Coello, H. Iturriaga, S. Maspoch y E. Bertran, *Analyst*, 119, 1779 (1994).
23. T. G. Díaz, M. I. Acedo y F. Salinas, *Fresenius J. Anal. Chem.* 350, 692 (1994).
24. M.J. Arrabal, P.V. Gonzalez, C.C. Gámez y A.S. Misiego, *Analyst*, 119, 1537 (1994).
25. M.M. Galera, J.L. Martinez A.C. Frenich y I. Parrilla, *Analyst*, 119, 1189 (1994).
26. B.M. Quencer y S.R. Crouch, *Anal. Chem.*, 66, 458 (1994).
27. M. Blanco, J. Coello, H. Iturriaga, S. Maspoch y J. Riba, *Anal. Chem.*, 66, 2905 (1994).
28. Y.S. Hsieh y S.R. Crouch, *Anal. Chim. Acta*, 296, 333 (1994).
29. M. Blanco, J. Coello, H. Iturriaga, S. Maspoch y M. Redón, *Anal. Chim. Acta*, 303, 309 (1995).
30. F. Navarro, L.V. Perez M.E. Leon y L.M. Polo-Diez, *Anal. Chim. Acta*, 308, 238 (1995).
31. J.M. Estela, A. Cladera y V. Cerdá, *Anal. Chim. Acta*, 310, 307(1995).
32. J. Saurina y S. Hernandez, *Analyst*, 120, 305 (1995).

33. J.M. García, A.I. Jimenez, J.J. Arias, K.D. Khalaf, A. Morales y M. Guardia, *Analyst*, 120, 313 (1995).
34. L. Cuadros, A.M. García, F. Alés, C. Jiménez y M. Román, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 78, 795 (1995).
35. R. Cela (coordinador). *Avances en Quimiometría práctica*, Universidad de Santiago de Compostela, pgs 225 y sig. (1994).
36. M.J.R. Stone, *Statist. Soc.*, 36, 111 (1974).
37. D.W. Osten, *J. Chem.*, 2, 39 (1988).
38. D.M. Haaland y E.V. Thomas. *Anal. Chem.*, 60, 1193 (1988).

UNIVERSIDAD DE GRANADA 145

25 ABR. 2000

COMISION DE DOCTORADO



CAPÍTULO 2

ESTUDIO DEL TIABENDAZOL MEDIANTE
ESPECTROFOSFORIMETRÍA EN FASE SÓLIDA

ÍNDICE DEL CAPÍTULO

2.1	CARACTERÍSTICAS FOSFORESCENTES DEL TIABENDAZOL	149
2.1.1	Espectros de luminiscencia total del TBZ en fase sólida	150
2.1.2	Espectros bidimensionales del TBZ en fase sólida	153
2.2	OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES EXPERIMENTALES	154
2.2.1	Optimización de variables experimentales de la muestra	154
2.2.1.1	<i>Elección del soporte sólido</i>	154
2.2.1.2	<i>Selección del metal pesado</i>	155
2.2.1.3	<i>Influencia de la concentración de metal pesado</i>	156
2.2.1.4	<i>Influencia del volumen de disolución del metal pesado</i>	158
2.2.1.5	<i>Influencia del uso de láminas de cuarzo y atmósfera de N₂</i>	159
2.2.1.6	<i>Influencia del pH del medio</i>	161
2.2.1.7	<i>Influencia de la fuerza iónica del medio</i>	162
2.2.1.8	<i>Influencia del volumen de muestra depositado en el papel</i>	163
2.2.1.9	<i>Influencia del tiempo de secado</i>	163
2.2.2	Optimización de variables instrumentales	164
2.2.2.1	<i>Optimización del ancho de rendijas</i>	165
2.2.2.2	<i>Optimización de los tiempos de retraso y lectura del detector</i>	165
2.3	PROCEDIMIENTO OPERATORIO	166
2.4	RELACIÓN ENTRE CONCENTRACIÓN Y SEÑAL ANALÍTICA	167
2.5	PARÁMETROS ANALÍTICOS	168
2.5.1	Recta de calibrado	168
2.5.2	Linealidad	170
2.5.3	Sensibilidad	170
2.5.4	Límites de detección y cuantificación	170
2.5.5	Rango dinámico lineal	171
2.5.6	Precisión	171
2.6	ESTUDIO DE INTERFERENCIAS	173
2.7	APLICACIONES ANALÍTICAS	174
2.7.1	Determinación de TBZ en aguas	174
2.7.1.1	<i>Aguas minerales, de río y potable</i>	174
2.7.1.2	<i>Agua de mar</i>	175
2.7.2	Determinación de TBZ en productos vegetales	181
2.8	VALIDACIÓN DEL MÉTODO MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN	185
	BIBLIOGRAFÍA	187

El 2-(tiazol-4-il)-1H-benzimidazol, comúnmente llamado tiabendazol (TBZ), es un poderoso fungicida sistémico muy utilizado para la conservación y almacenamiento de frutas y verduras ya que previene la acción microbiana después de la cosecha. Dado su uso frecuente en agricultura se encuentra presente en numerosas formulaciones bien como componente único o en combinación con otros pesticidas que complementan su acción.

La solubilidad del TBZ en agua puede llegar a ser el 3,8 % en peso dependiendo del pH del agua, razón por la cual se pueden detectar cantidades de TBZ relativamente altas en aguas procedentes de la agricultura y de ahí la necesidad de disponer de métodos de determinación de trazas de TBZ, no sólo en las aguas mencionadas, sino también en los productos agrícolas para cuya conservación se suele utilizar TBZ en cualquiera de sus formulaciones comerciales.

2.1 CARACTERÍSTICAS FOSFORESCENTES DEL TIABENDAZOL

En los espectrómetros convencionales de luminiscencia, la existencia de dos monocromadores permite el registro de varios tipos de espectros de los que mencionaremos los siguientes:

- *Espectros de excitación*: obtenidos al registrar el espectro manteniendo fija la longitud de onda de emisión y variando progresivamente la longitud de onda de excitación.
- *Espectros de emisión*: obtenidos, en este caso, variando la longitud de onda de emisión para una longitud de onda de excitación fija.
- *Espectros sincrónicos*: que se obtienen moviendo a la vez ambos monocromadores a la misma velocidad y manteniendo constante un intervalo entre las longitudes de onda de emisión y excitación.

No obstante, las características fosforescentes de un determinado compuesto no quedan totalmente patentes en los espectros anteriormente citados ya que en ellos sólo podemos observar aspectos parciales del comportamiento luminiscente del analito. Una mejor visión de la luminiscencia, en nuestro caso fosforescencia, del mismo la podemos conseguir mediante el espectro tridimensional de fosforescencia. En este tipo de espectros en uno de los ejes se representa la longitud de onda de excitación, en otro se representa la longitud de onda de emisión y en el tercero se representan las intensidades de fosforescencia emitidas por la muestra. Tales espectros, que son conocidos como espectros de excitación - emisión ó de fosforescencia total, se representan mediante una proyección isométrica de N espectros individuales superpuestos.

La obtención de los mismos, en nuestro caso, ha sido posible mediante una conexión (RS-232C) entre el espectrofluorímetro y un ordenador tipo PC, utilizando el programa informático Fluopack, suministrado por Perkin-Elmer para recogida y tratamiento de datos así como el programa informático Golden Surfer para la representación tridimensional. El programa Fluopack permite, entre otras opciones, registrar 30 barridos de emisión, cada uno a una longitud de onda de excitación constante, incrementándose esta longitud de onda en una cantidad fija entre un barrido y el siguiente. Los espectros obtenidos son archivados para su representación y posterior tratamiento de los datos.

2.1.1 Espectro de luminiscencia total del TBZ en fase sólida.

Con objeto de obtener el espectro de fosforescencia total del TBZ en fase sólida a temperatura ambiente, se utilizó papel cromatográfico Wathman nº 4 (W4) como soporte sólido, procediendo de acuerdo con el siguiente método operatorio:

sobre el soporte sólido se depositaron 2,5 μL de disolución saturada (1,1 M) de $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ y 1,5 μL de disolución de TBZ de $1,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. A continuación se secó la muestra durante 3 minutos, mediante aire caliente producido por un secador de pelo de uso doméstico, hasta que la muestra quedó totalmente seca. Se colocó la muestra entre dos láminas de cuarzo de $4,5 \times 1 \times 0,1 \text{ cm}$ y se registraron los espectros de fosforescencia total bajo las siguientes condiciones instrumentales: $t_g = 0,1 \text{ ms}$; $t_d = 12 \text{ ms}$; intervalo de longitud de onda excitación 260-350 nm; intervalo de longitud de onda de emisión 350-600 nm; espaciado entre barridos ($\Delta\lambda_{\text{exc}}$): 3 nm; número de barridos: 30; rendija de excitación: 2,5 nm; rendija de emisión: 5 nm y velocidad de barrido: $240 \text{ nm}\cdot\text{min}^{-1}$.

En la figura 2.1 se muestra el espectro obtenido, visto desde cuatro ángulos diferentes, después de eliminar la contribución del blanco. Como se puede apreciar en la citada figura, el TBZ en fase sólida, presenta un máximo de emisión fosforescente situado a 303 nm de longitud de onda de excitación y 473 nm de emisión.

Mediante el programa informático Golden Surfer, anteriormente citado, estos datos del espectro tridimensional pueden ser manipulados de forma que, uniendo los puntos de igual intensidad de emisión fosforescente, nos resultan las curvas de nivel que podemos ver en la figura 2.2, en las que se aprecia con claridad la situación del máximo espectral.

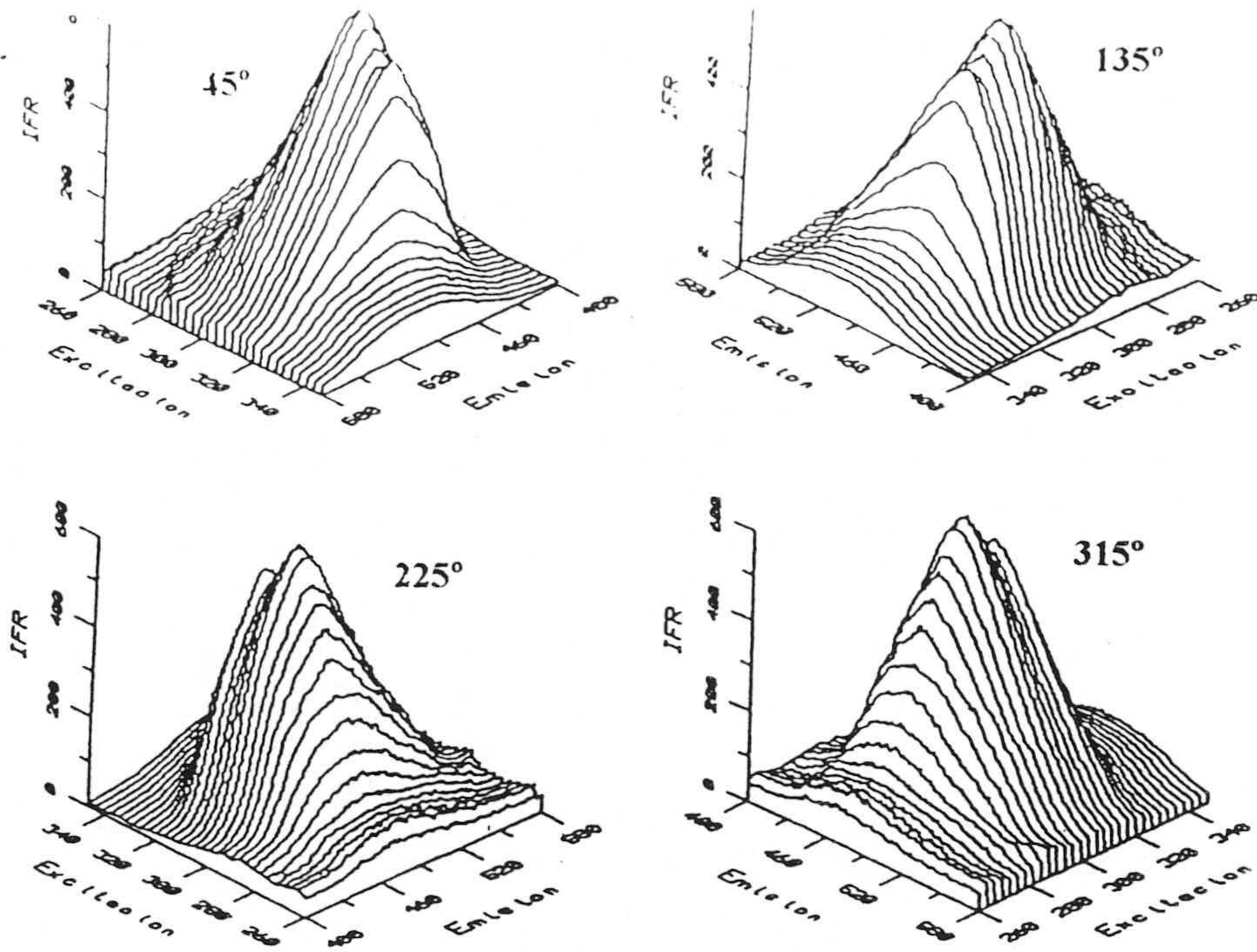


Figura 2.1. Espectros de fosforescencia total del TBZ en fase sólida, desde diferentes ángulos.

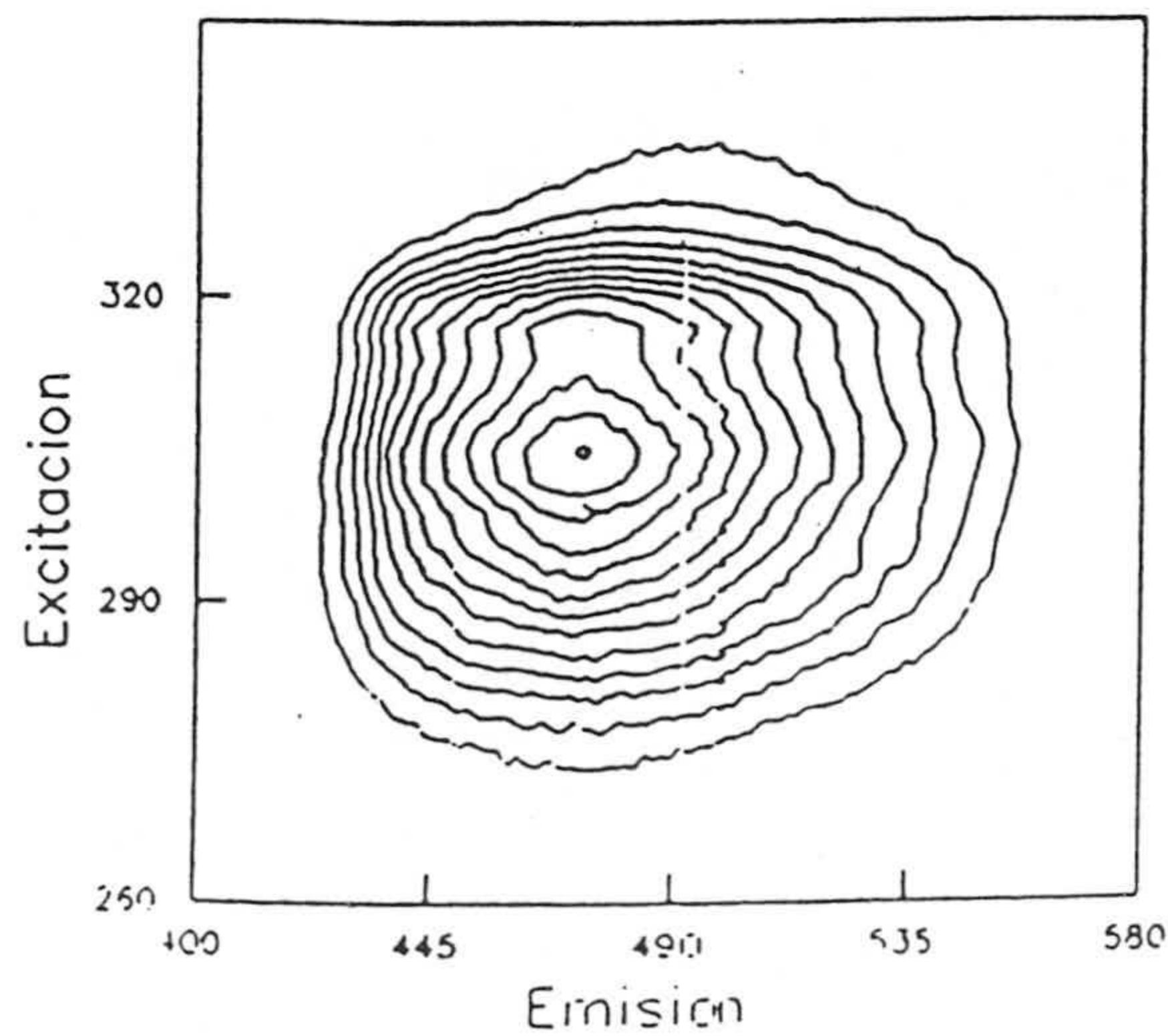


Figura 2.2. Curvas de nivel del TBZ en fase sólida

2.1.2 Espectros bidimensionales del TBZ en fase sólida.

Conocida la posición del máximo espectral, obtenida a partir del topograma de la figura 2.2, se procedió a registrar los espectros bidimensionales de excitación y emisión del TBZ en fase sólida dado que con ellos se facilita la optimización de las diferentes variables experimentales que afectan a la emisión fosforescente. Para ello, la muestra se preparó de la forma descrita anteriormente y los espectros se registraron bajo las siguientes condiciones instrumentales: para el espectro de excitación, la longitud de onda de emisión fue 473 nm, registrándose el espectro entre 260 y 360 nm de longitud de onda de excitación y para el espectro de emisión la longitud de onda de excitación fue 303 nm registrándose el espectro entre 380 y 600 nm. Los espectros obtenidos los podemos observar en la figura 2.3.

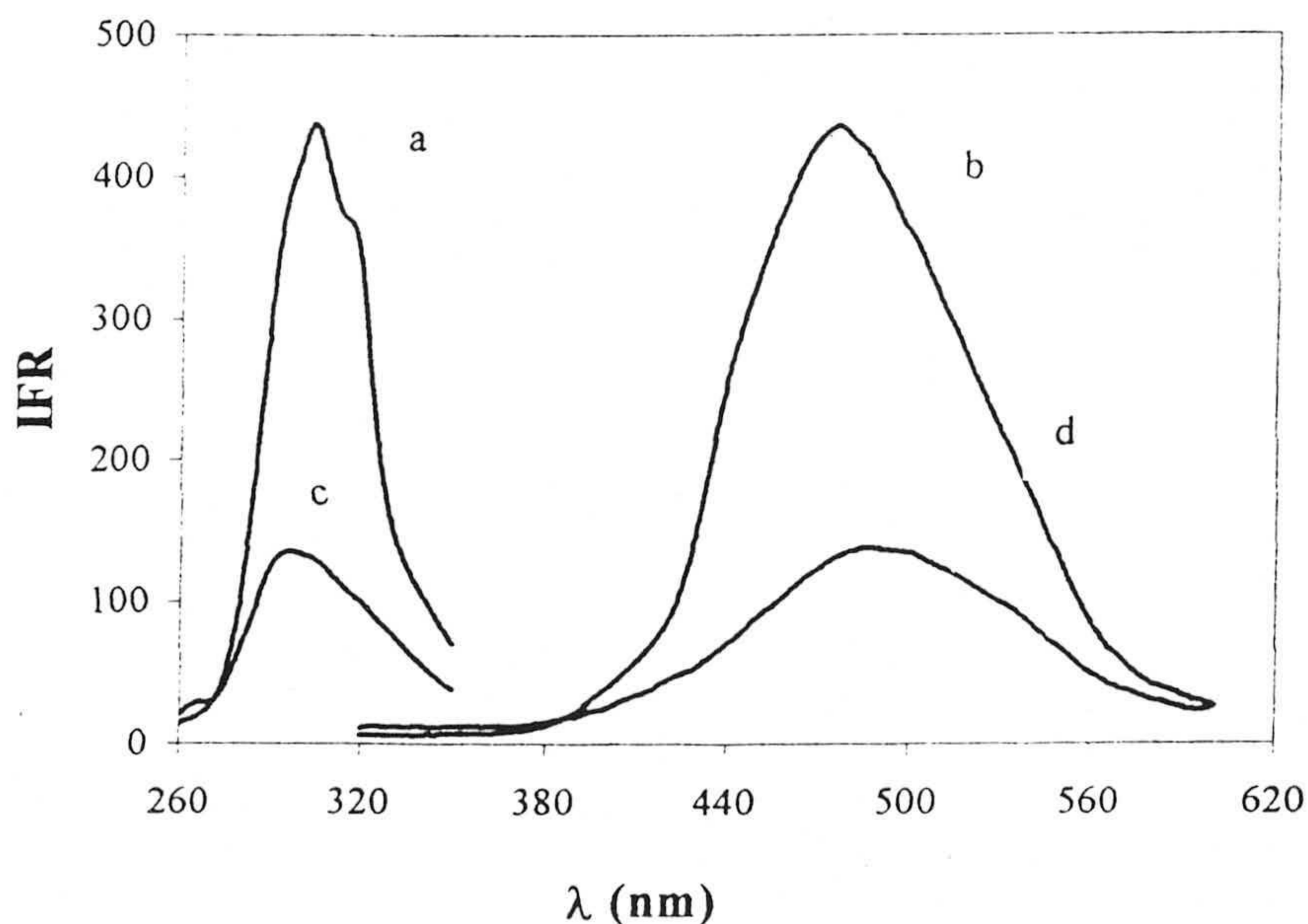


Figura 2.3. Espectros de excitación y emisión en fase sólida: (a,b) de la muestra de TBZ y (c,d) del blanco.

2.2 OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES EXPERIMENTALES

. La optimización de cada una de las variables, tanto las instrumentales como las referentes a la preparación de la muestra, se llevó a cabo manteniendo constantes los valores de todas ellas, excepto el de aquella variable que se deseaba estudiar, estableciendo entonces su influencia sobre la intensidad de fosforescencia emitida por el analito. Procediendo de esta forma se estudió la influencia de las siguientes variables experimentales: naturaleza del soporte sólido, naturaleza, concentración y volumen de disolución de átomo pesado, presencia de oxígeno y humedad atmosféricos, pH y fuerza iónica del medio, volumen de muestra depositado en el soporte sólido y tiempo de secado de la muestra y las siguientes variables instrumentales: anchura de rendijas de excitación y emisión, tiempos de lectura del detector (t_g) y de retraso en su apertura (t_d).

2.2.1 Optimización de variables experimentales de la muestra.

Para optimizar las variables experimentales que intervienen en la preparación de la muestra y que puedan afectar a la emisión fosforescente, se procedió a efectuar un estudio sistemático utilizando para ello el máximo de fosforescencia del espectro de emisión registrado a 303 nm de excitación bajo las condiciones instrumentales anteriormente señaladas.

2.2.1.1 Elección del soporte sólido.

El primer objetivo que nos planteamos fue la elección del soporte sólido más adecuado. Con tal fin se seleccionaron *a priori* cinco tipos de papel comúnmente utilizados en fosforescencia a temperatura ambiente, según la bibliografía existente sobre el tema [1-11]. Estos soportes fueron: papeles cromatográficos Whatman n°

1 y nº 4, papeles de cambio iónico Whatman P-81 (catiónico) y DE-81 (aniónico) y papel de filtro Albet N° 1305.

La forma de proceder para la preparación de las muestras fue la misma en todos los casos, e igual a la descrita en los apartados anteriores, preparándose en cada caso el correspondiente blanco. Los datos obtenidos se recogen en la tabla 2.1.

Tabla 2.1 Influencia de la naturaleza del soporte sólido sobre la intensidad de fosforescencia.

Tipo de papel	IF muestra	IF blanco	Δ (IF)
Whatman nº 4	472,3	137,6	334,7
Whatman nº 1	390,5	150,1	240,4
Whatman P-81	220,4	95,0	125,0
Whatman DE-81	190,9	150,1	40,8
Albet nº 1305	350,8	140,4	210,4

Los valores de intensidad de fosforescencia que figuran en esta tabla son la media de tres determinaciones diferentes.

Con los resultados que figuran en la tabla 2.1 se puede comprobar que el papel cromatográfico Whatman nº 4 es el que, en igualdad de condiciones, favorece la aparición

de una mayor intensidad de fosforescencia relativa Δ (IF), razón por la cual se eligió como soporte sólido para posteriores experiencias.

2.2.1.2 Selección del metal pesado.

Un hecho conocido en fosforescencia es el papel que ejercen los átomos pesados, cationes o aniones voluminosos, sobre la intensidad de la emisión fosforescente. En la mayoría de los casos su presencia no sólo es decisiva para que se lleve a cabo el proceso fosforescente sino que además, una adecuada elección del metal pesado o del anión, permite incrementar sensiblemente la intensidad de la señal fosforescente gracias a que facilita el proceso de tránsito electrónico entre el estado singlete excitado y el estado triplete, como consecuencia de un incremento en el acoplamiento spin-orbital entre ambos estados.

En el caso del TBZ se ensayaron una serie de metales pesados en forma de nitratos y acetatos, así como varios aniones voluminosos. Las especies químicas ensayadas fueron las siguientes: Pb(II), Ag(I), Tl(I) y Hg(II) como cationes y halogenuros como aniones. Los resultados obtenidos son los que se incluyen en la tabla 2.2.

Tabla: 2.2. Influencia de iones pesados sobre la IF del TBZ

Metal	IFR	DNR (%)	Halogenuro	IFR	DNR (%)
sin	37,1	4,75	F ⁻	25,6	5,8
Pb(II)	342,3	1,85	Cl ⁻	50,4	4,2
Tl(I)	92,8	3,53	Br ⁻	90,5	3,5
Hg(II)	50,9	2,65	I ⁻	124,4	2,1
Ag(I)	30,5	4,55			

IFR: Intensidad de fosforescencia relativa.

DNR (%): Desviación normal relativa.

A vista de los resultados que figuran en la tabla anterior se decidió la utilización de Pb(II), en forma de acetato, como metal pesado más adecuado para incrementar la emisión de fosforescencia en futuras experiencias, ya que se consiguen valores de intensidad de fosforescencia superiores a los obtenidos con cualquier otra de las sales ensayadas. Paralelamente se puede comprobar que el incremento de intensidad de fosforescencia producido por la presencia de halogenuros, aumenta con el volumen del ión utilizado de manera que la intensidad de emisión fosforescente aumenta de acuerdo con el siguiente orden: F⁻ < Cl⁻ < Br⁻ < I⁻.

2.2.1.3 Influencia de la concentración de la disolución de metal pesado.

Una vez elegido el Pb(II) como especie más apropiada para incrementar la emisión fosforescente, se procedió al estudio de la influencia que sobre esta pueda ejercer la concentración de metal. Para ello se realizó una experiencia en la que se midió la señal de fosforescencia emitida por distintas muestras preparadas con dife-

rentes concentraciones de Pb(II) comprendidas entre 0,05 y 1,1 mol.L⁻¹, concentración esta última que corresponde a una disolución saturada de acetato de plomo en agua. Tanto las muestras como sus respectivos blancos, fueron preparadas en las condiciones que hemos venido utilizando hasta este momento y las medidas de fosforescencia se realizaron bajo las condiciones instrumentales ya señaladas con anterioridad.

Los datos obtenidos, que están incluidos en la tabla 2.3 y se han representado en la figura 2.4, son la media de tres medidas independientes para cada uno de los casos, lo que nos permite obtener el valor de la desviación normal relativa que figura en la última columna de la citada tabla.

Figura 2.4 Influencia de la concentración de Pb(II)

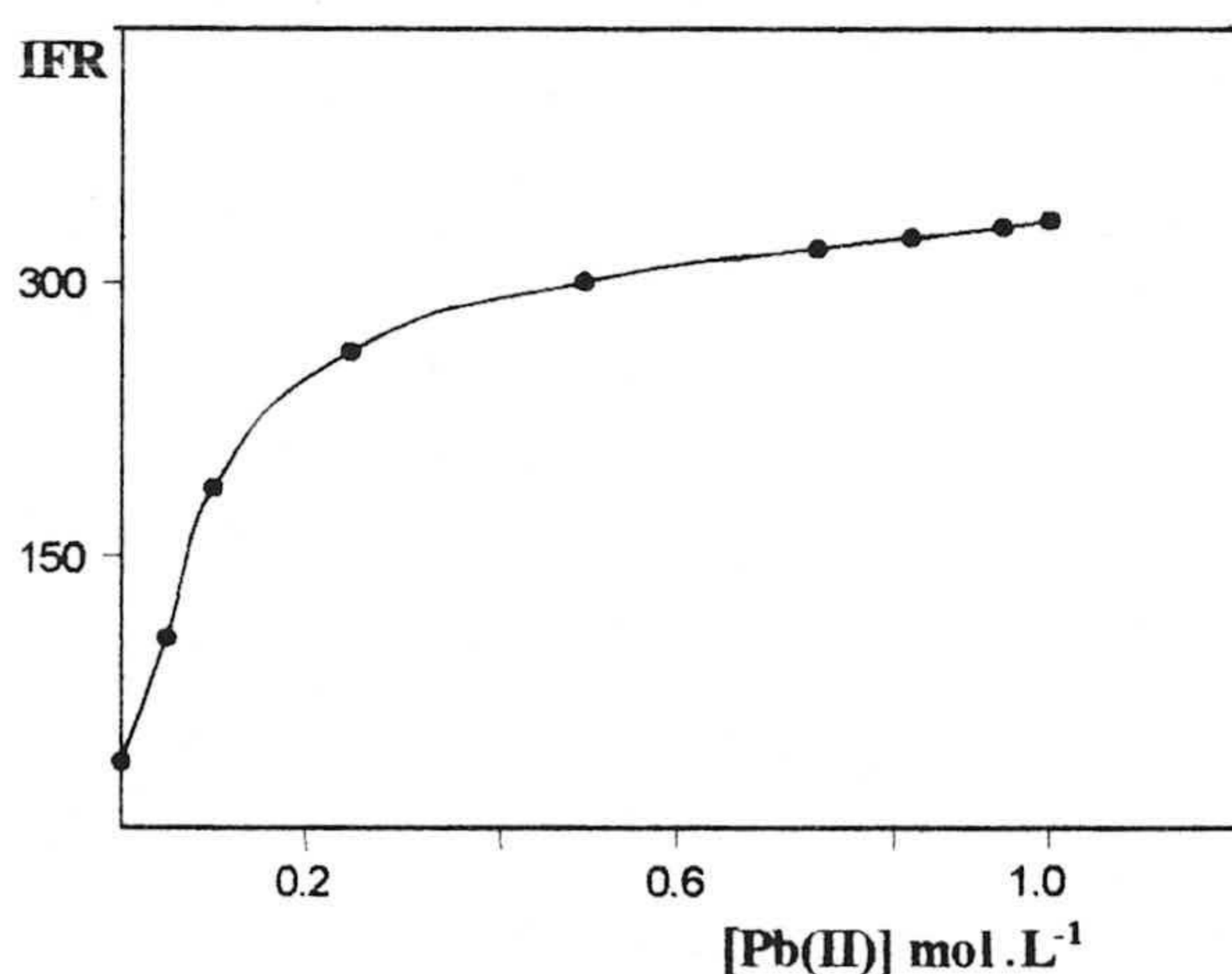


Tabla 2.3.

[Pb(II)]M	IFR	DNR %
0,00	36,6	1,64
0,05	103,0	2,80
0,10	189,8	1,70
0,25	261,5	2,53
0,50	300,0	2,36
0,75	318,2	2,13
0,85	325,9	0,80
0,95	332,3	2,34
1,10	334,3	1,80

Con los resultados obtenidos podemos decir que la intensidad de fosforescencia crece cuando aumenta la concentración del metal pesado hasta alcanzar un valor máximo si la concentración de la disolución de Pb(CH₃COO)₂ es 1,1 M, valor este que corresponde a la disolución saturada y que fue elegido para posteriores experiencias.

2.2.1.4 Influencia del volumen de disolución de metal pesado.

Con objeto de determinar el volumen óptimo de disolución de metal pesado necesario para obtener la máxima intensidad de fosforescencia, se estudió a continuación la posible influencia de esta variable sobre la señal analítica, preparando para ello distintas muestras en las que el volumen de disolución de Pb(II) variaba entre 0,25 y 2,5 μL de disolución saturada. Los resultados obtenidos se representan en la figura 2.5 y se resumen en la tabla 2.4 donde también figuran las desviaciones normales de las tres réplicas medidas en cada caso.

Figura 2.5 Influencia del volumen de disolución de metal pesado

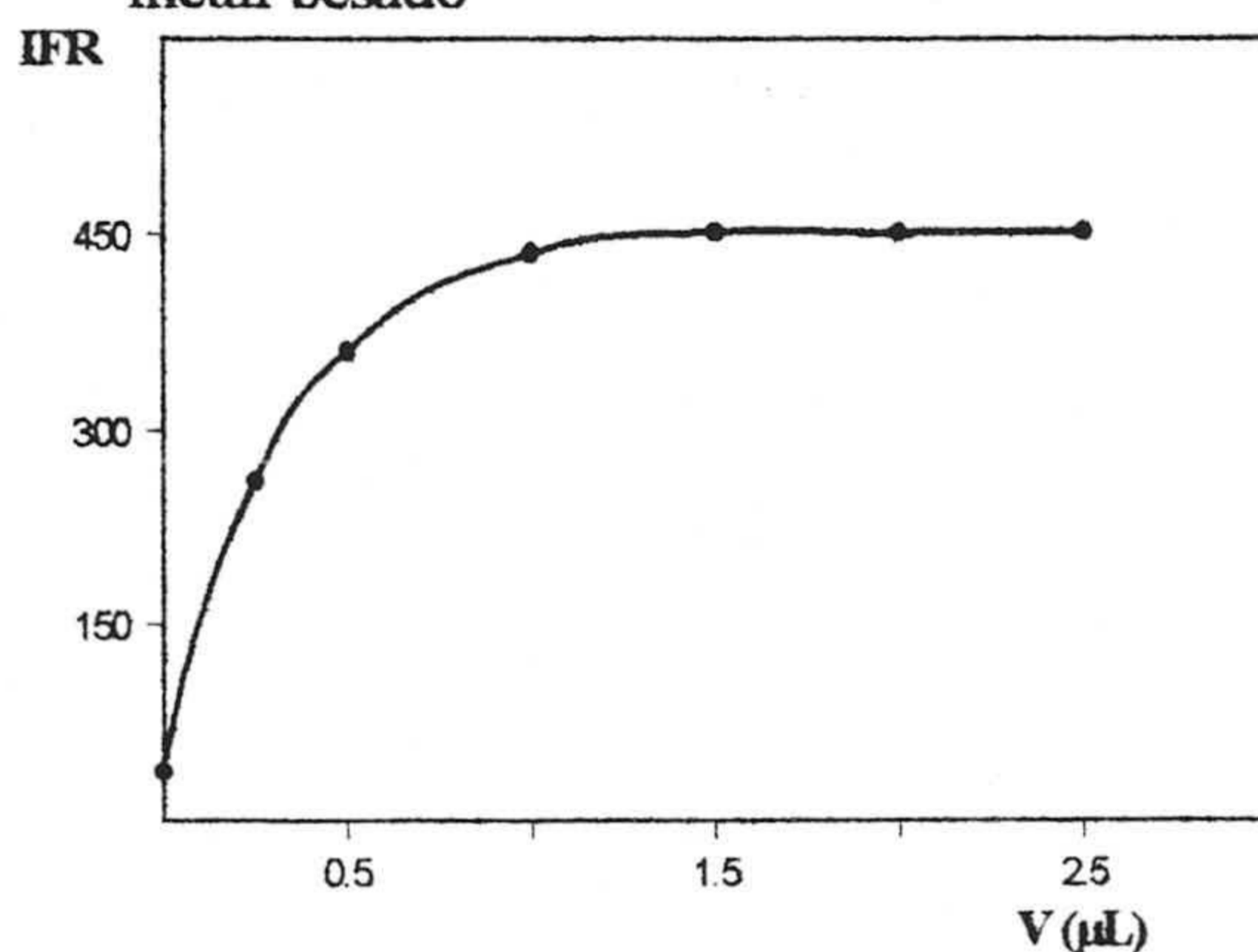


Tabla.2.4

V (μL)	IFR	DNR%
0,00	37,3	4,25
0,25	260,5	3,5
0,50	361,3	3,0
1,00	435,6	2,3
1,50	451,4	2,0
2,00	451,1	2,5
2,50	452,0	2,4

De los resultados obtenidos de esta experiencia podemos decir que la señal de fosforescencia transmitida crece significativamente al aumentar el volumen de la disolución de Pb(II) hasta que este alcanza un valor de 1,5 μL , a partir del cual el aumento no es significativo. Para posteriores experiencias se ha fijado este volumen como valor óptimo para exaltar la fosforescencia del TBZ.

2.2.1.5 Influencia del uso de láminas de cuarzo y de atmósfera de N_2 .

Como ya se ha indicado, la presencia de oxígeno produce una disminución de la señal de fosforescencia de los fósforos, lo que hace imprescindible llevar a cabo un estudio para establecer dicha influencia. Para disminuir el efecto tanto del oxígeno atmosférico como de la humedad se pensó en utilizar dos láminas de cuarzo para colocar el papel con la muestra entre ambas en el momento de efectuar la medida de fosforescencia.

Se realizaron cuatro experiencias, en una de ellas se hicieron medidas de fosforescencia en presencia de oxígeno atmosférico sin utilizar las láminas de cuarzo, en la segunda se utilizaron las láminas en presencia de oxígeno, en la tercera no se utilizaron las láminas pero se efectuaron las medidas bajo una atmósfera de N_2 seco y en la cuarta se utilizó también atmósfera de N_2 así como las láminas de cuarzo. En todos los casos las muestras fueron preparadas en la forma descrita con anterioridad y se midieron bajo las condiciones instrumentales ya señaladas. Los resultados obtenidos están incluidos en la tabla 2.5 y se representan gráficamente en la figura 2.6.

Se deduce que la utilización de láminas de cuarzo incrementa sensiblemente la señal de fosforescencia producida por el analito tanto en atmósfera inerte de N_2 como sin ella, al menos durante los primeros minutos desde la preparación de la muestra. Este hecho nos permite realizar las medidas de fosforescencia sin necesidad de utilizar la atmósfera inerte siempre que la medida se efectúe dentro de dicho intervalo de tiempo.

Tabla 2.5. Influencia del uso de láminas de cuarzo y corriente de N₂ sobre la IFR del TBZ.

Tiempo (min)	IFR CSN	IFR CCN	IFR SCN	IFR SSN
0	415	422	213	170
2	426	428	224	165
4	426	429	228	155
6	421	429	233	145
8	418	431	232	135
10	414	429	232	132
12	410	427	232	127
14	406	425	229	120
16	400	423	229	115
18	390	421	226	110
20	374	420	225	105
22	360	420	225	102
24	446	420	222	97
26	435	418	221	92
28	321	415	220	87
30	305	413	218	81

CCN: Con láminas y corriente de nitrógeno. **CSN:** Con láminas y sin corriente de nitrógeno. **SCN:** Sin láminas y con corriente de nitrógeno. **SSN:** Sin láminas ni corriente de nitrógeno.

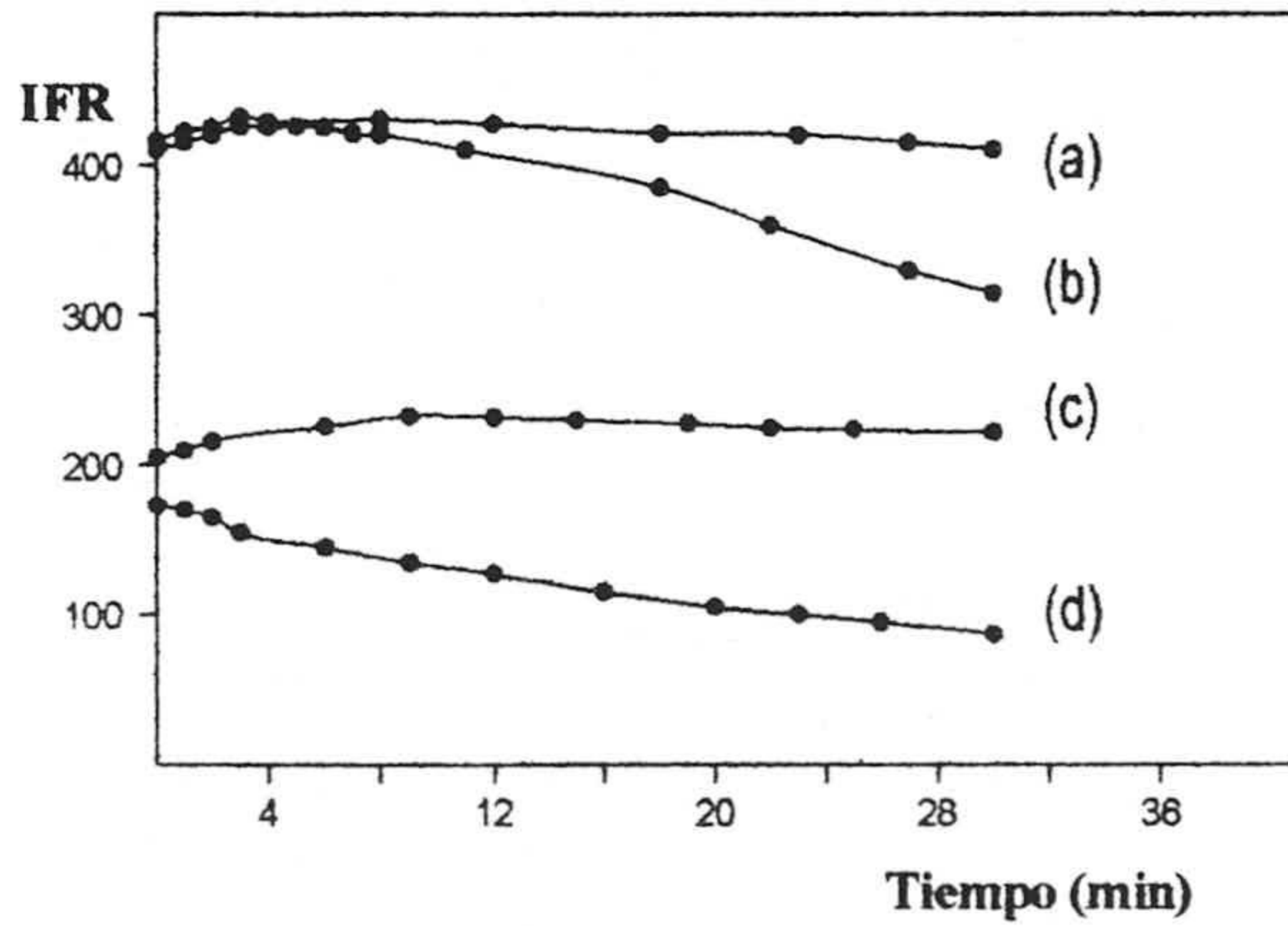


Figura 2.6. Intensidad de fosforescencia. (a) Con láminas y N₂. (b) Con láminas sin N₂. (c) Sin láminas con N₂. (d) Sin láminas ni N₂.

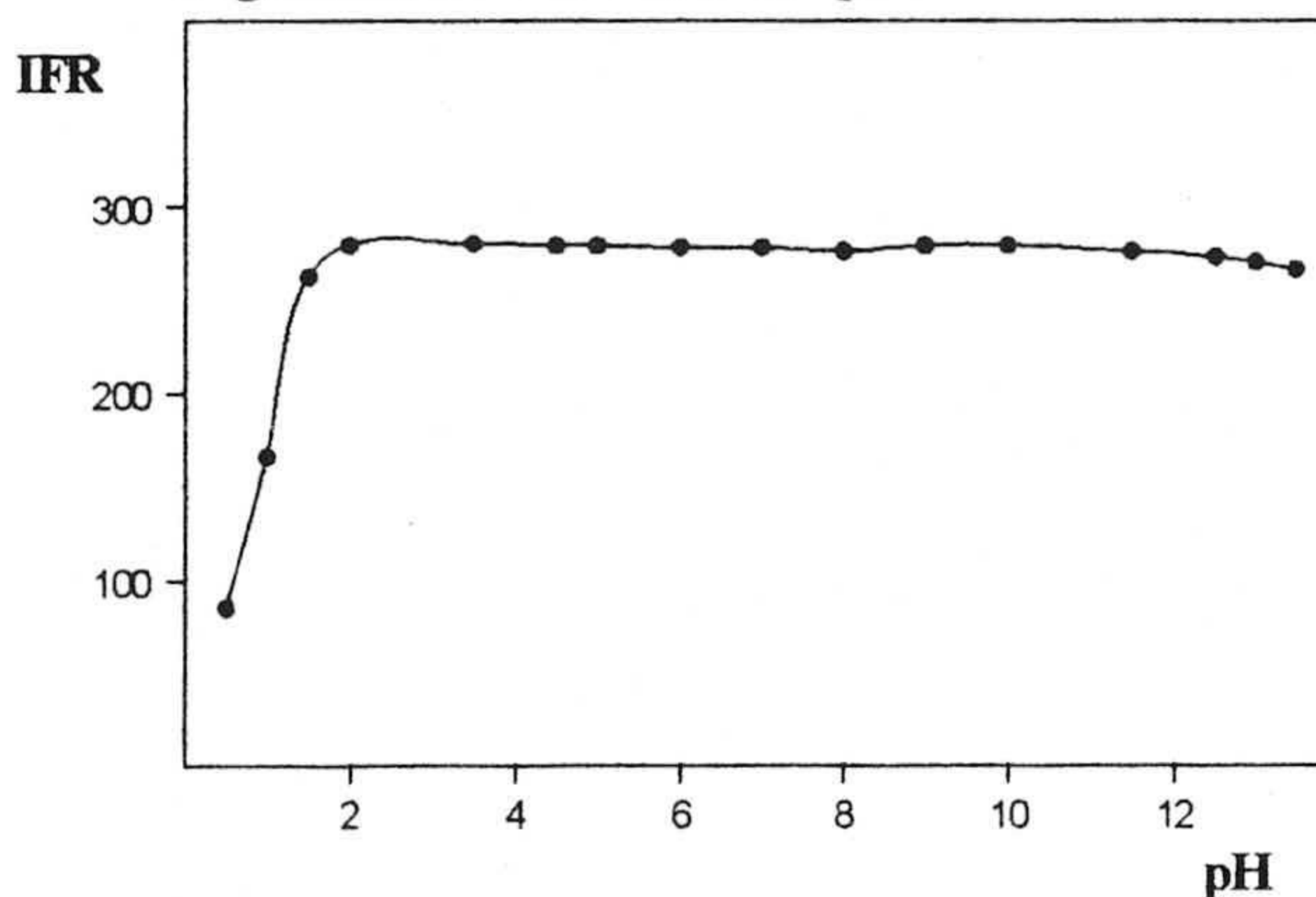
2.2.1.6 Influencia del pH de la disolución de la muestra.

Con el fin de determinar la influencia del pH de la disolución de analito sobre la intensidad de fosforescencia emitida, se preparó una serie de disoluciones de analito en las que el pH variaba entre 0,5 y 13,5 utilizando para ello disoluciones de HCl y NaOH de diferentes concentraciones y manteniendo las mismas condiciones experimentales anteriormente reseñadas. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 2.6, y se representan en la figura 2.7.

Tabla 2.6

pH	IFR	pH	IFR
0,5	100	7,0	278
1,0	160	8,0	276
1,5	262	9,0	279
2,0	279	10,0	277
3,5	280	11,5	279
4,5	279	12,5	273
5,0	279	13,0	270
6,0	278	13,5	267

Figura 2.7. Influencia del pH.



La observación de la anterior figura nos permite confirmar que en el intervalo de pH comprendido entre 2,0 y 13,5 la intensidad fosforescencia permanece prácticamente constante, disminuyendo bruscamente para valores de pH inferiores a 2,0 probablemente debido a la precipitación del PbCl_2 no por la disminución del pH sino por el aumento de la concentración de HCl necesario para conseguirlo. En nuestro caso, dado que el pH natural de la disolución de TBZ se encuentra en la zona central del intervalo en el cual la fosforescencia es máxima, no es necesario el uso de una disolución reguladora de pH para efectuar la medida, sin embargo, se ha utili-

zando una disolución reguladora $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COO}^-$ (1,1M) de $\text{pH} = 4,1$ para asegurar que el pH de todas las muestras es siempre el mismo.

2.2.1.7. *Influencia de la fuerza iónica.*

Con el fin de saber la influencia que ejerce la fuerza iónica sobre la intensidad fosforescente del TBZ hemos empleado cloruro sódico como electrolito dado que una de las aplicaciones del método que proponemos es la determinación de TBZ en agua de mar. Se prepararon varias disoluciones en las cuales, manteniendo constantes todas las demás variables, se pusieron cantidades crecientes de NaCl que variaban entre 0 y 0,5 M. La preparación de la muestra y las medidas de fosforescencia se realizaron de la misma forma que hemos descrito con anterioridad. Los resultados experimentales figuran en la tabla 2.7 y se representan en la figura 2.8.

Figura 2.8. Influencia de la fuerza iónica sobre la intensidad fosforescente del TBZ.

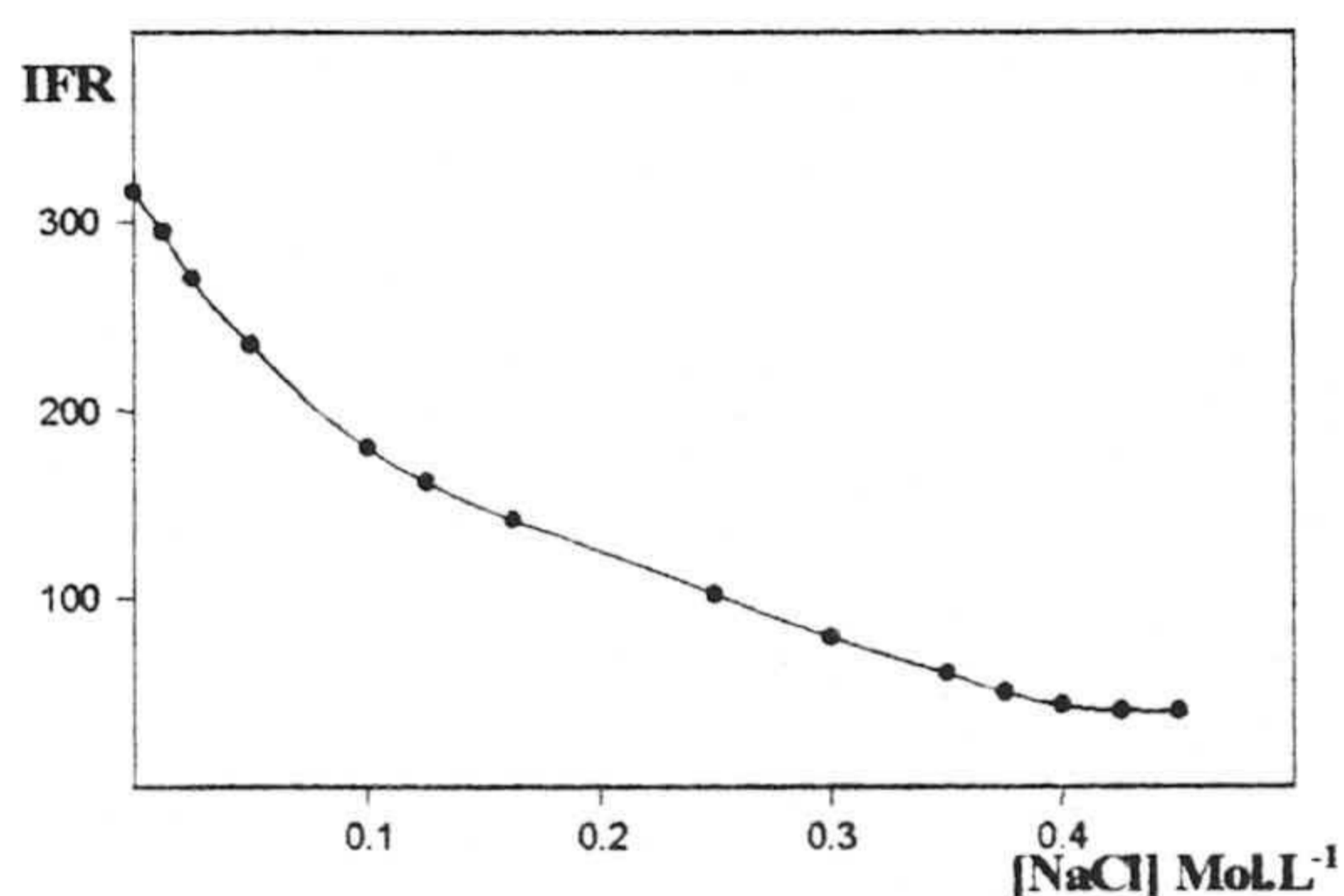


Tabla 2.7. Influencia de la fuerza iónica (NaCl).

[NaCl] M	IFR	DNR (%)	[NaCl] M	IFR	DNR (%)
0,0000	316,4	1,96	0,2500	102,4	3,03
0,0125	295,5	2,16	0,3000	83,6	2,25
0,0250	270,3	2,08	0,3500	65,7	4,23
0,0500	235,4	2,92	0,3750	58,8	2,84
0,1000	180,5	3,33	0,4000	50,2	3,45
0,1250	162,2	3,15	0,4250	40,3	3,37
0,1625	142,1	3,56	0,4500	40,1	3,77

Datos promedios de tres determinaciones diferentes.

DNR = Desviación Normal Relativa.

De los resultados anteriores se pudo concluir que la presencia de NaCl disminuye la intensidad fosforescente transmitida, observándose una caída del 43% para una concentración 0,1 M de NaCl y una desaparición de la señal cuando la con-

centración es 0,5 M. Esta disminución de la intensidad de fosforescencia del TBZ puede ser atribuida a la precipitación de cloruro por el cation Pb(II).

2.2.1.8 Influencia del volumen de muestra depositado sobre el papel.

Otra de las variables que influyen en la intensidad de fosforescencia es el volumen de muestra depositado sobre el soporte sólido. Para estudiar esta influencia se prepararon diferentes muestras en las que el volumen de muestra depositado variaba entre 0,5 y 6,0 μL , manteniendo constantes las restantes variables experimentales. Los resultados obtenidos a partir de tres réplicas independientes se resumen en la tabla 2.8 y están representados en la figura 2.9. Como conclusión se puede decir que 2,5 μL de disolución de TBZ son suficientes para cubrir la superficie de muestra irradiada por el haz de excitación.

Figura 2.9 Influencia del volumen de muestra sobre la intensidad fosforescente del TBZ.

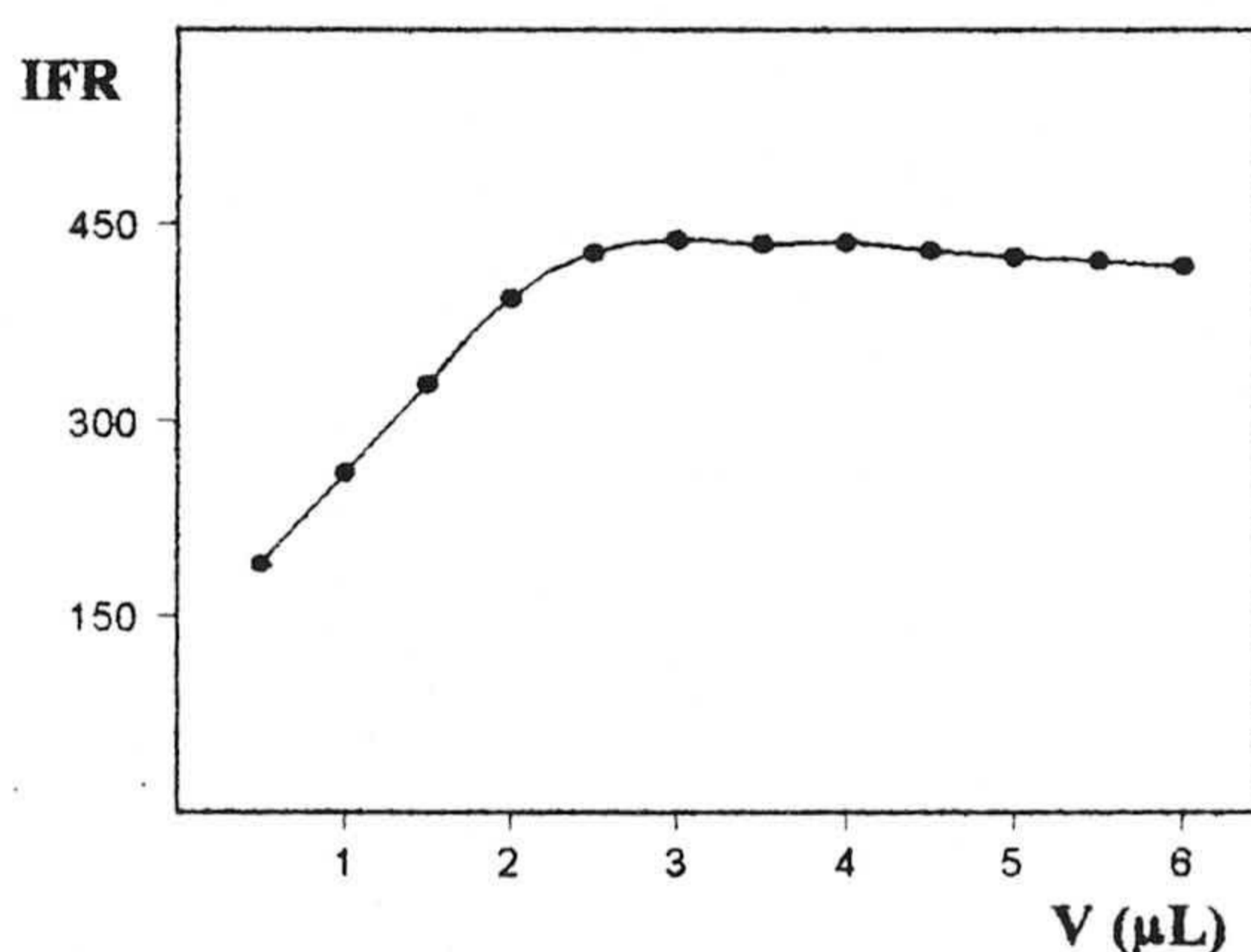


Tabla 2.8

V (μL)	IFR	DNR%
0,5	190	4,06
1,0	260	3,04
1,5	328	2,55
2,0	394	2,42
2,5	435	2,03
3,0	438	1,94
3,5	435	2,24
4,0	436	2,57
4,5	430	3,07
5,0	425	2,83
5,5	422	3,13
6,0	418	3,98

2.2.1.9 Influencia del tiempo de secado.

Uno de los parámetros experimentales que pueden ejercer un papel importante sobre la intensidad de fosforescencia es el tiempo de secado de la muestra ya que

está relacionado con el grado de humedad de la misma. Por ello se realizó una experiencia en la que se midió la señal de fosforescencia de distintas muestras secadas bajo una corriente de aire caliente, producida por un secador de pelo doméstico, durante periodos de tiempo que abarcan desde 0,5 hasta 7 minutos, con una potencia de 250 vatios y situando el secador a una altura de 10 cm sobre la muestra. Los datos obtenidos se resumen en la tabla 2.9 y se representan en la figura 2.10. Los resultados anteriores nos permiten decir que la señal de fosforescencia aumenta a medida que lo hace tiempo de secado hasta alcanzar un valor máximo a los 3 minutos a partir del cual permanece estable. Para posterior experiencias se fijó el tiempo de secado en 3 minutos.

Figura 2.10. Influencia del tiempo de secado

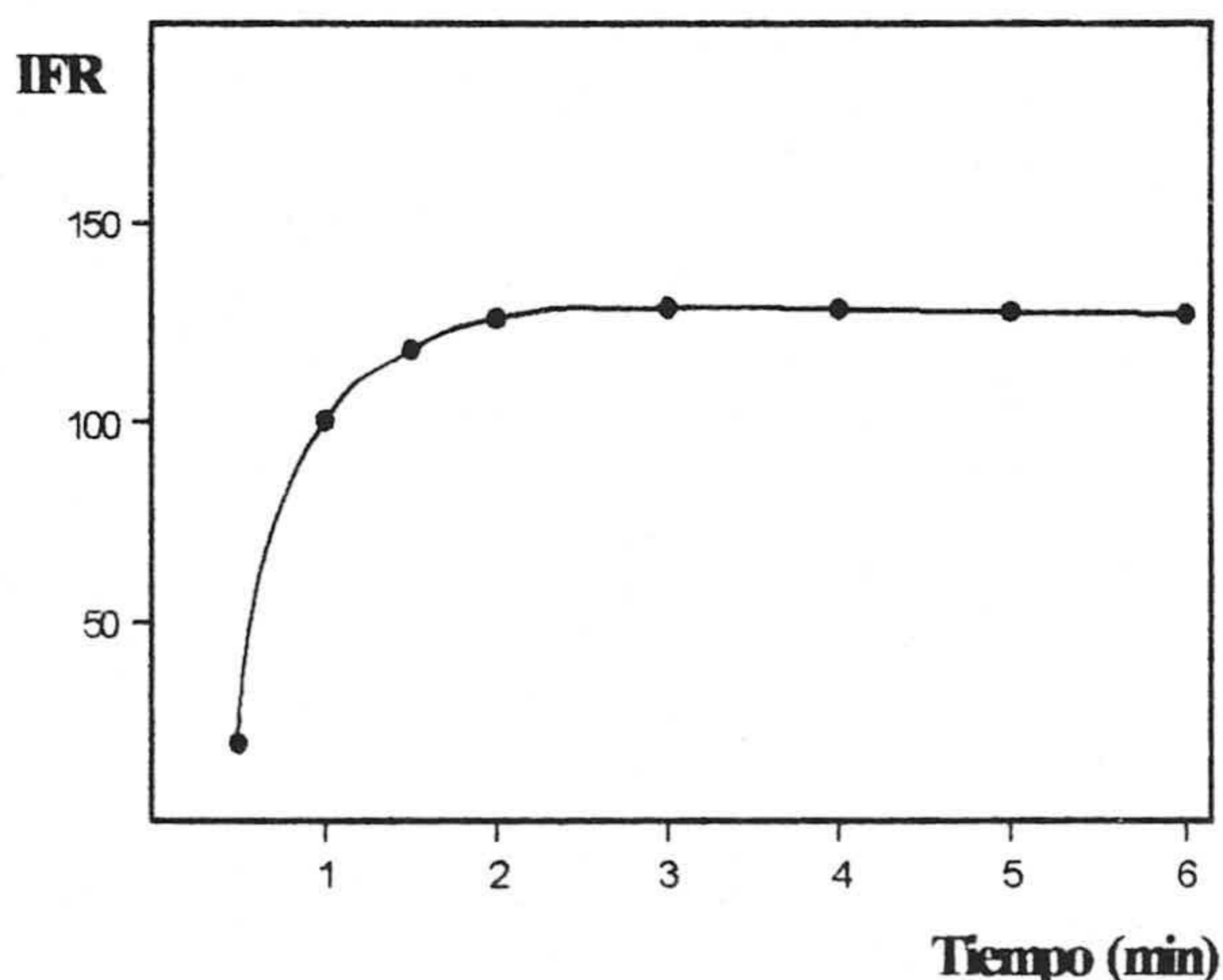


Tabla 2.9

Tiempo (min)	IFR	DNR %
0,5	10,4	4,2
1,0	90,3	3,1
1,5	317,8	1,2
2,0	397,7	2,3
2,5	430,5	2,4
3,0	438,4	0,9
3,5	438,8	2,7
4,0	436,4	3,3
4,5	437,7	1,9
5,0	435,6	1,1
5,5	432,6	2,4
6,0	428,3	3,3

2.2.2 Optimización de variables instrumentales.

Como es sabido, la intensidad de fosforescencia emitida por una especie fosforescente está muy condicionada por los valores de los distintos parámetros instru-

mentales entre los que cabe destacar los siguientes: tiempos de retraso (t_d) y de lectura del detector (t_g) y anchura de las rendijas de excitación y emisión.

2.2.2.1 Optimización de la anchura de las rendijas de excitación y emisión.

Para optimizar los valores correspondientes a las anchuras de las rendijas de excitación y emisión se registraron los espectros de emisión de una muestra, variando alternativamente las rendijas de emisión y excitación y manteniendo constantes los demás parámetros instrumentales. De los resultados obtenidos se deduce que 2,5 y 5,0 nm, para excitación y emisión respectivamente, son los valores más favorables.

2.2.2.2 Optimización de los tiempos de retraso y lectura del detector.

Para el estudio de estas variables se procedió de forma similar a la del apartado anterior, midiendo la intensidad de fosforescencia para tiempos de retraso (t_d) comprendidos entre 0,1 y 0,3 ms y tiempos de lectura del detector (t_g) comprendidos entre 1 y 12 ms. El valor mínimo de t_d fue de 0,1 ms porque corresponde al pulso de la lámpara de xenón instalada en el instrumento y el tiempo máximo de lectura del detector (t_g) es de 12 ms porque también está impuesto por las características técnicas del propio instrumento.

Tabla 2.10. Influencia de t_g y t_d sobre la IFR

t_d (ms)	t_g (ms)	IFR	t_d (ms)	t_g (ms)	IFR	t_d (ms)	t_g (ms)	IFR
0,1	6	260,6	0,2	6	255,4	0,3	6	270,7
0,1	8	280,7	0,2	8	288,2	0,3	8	290,1
0,1	10	310,7	0,2	10	315,6	0,3	10	310,5
0,1	12	340,6	0,2	12	345,7	0,3	12	350,4

Los resultados obtenidos en esta experiencia se resumen en la tabla 2.10, de donde se puede deducir que al aumentar el tiempo de lectura del detector, manteniendo constante el tiempo de retraso en la apertura, aumenta la intensidad fosforescente emitida observándose un incremento similar en todos los casos, mientras que al aumentar el tiempo de retraso manteniendo constante el de lectura, la intensidad fosforescente emitida es prácticamente la misma cualquiera que sea el valor de t_d . En consecuencia hemos elegido los valores de $t_g = 12$ ms y $t_d = 0,1$ ms como valores óptimos ya que con ellos se observa la mayor intensidad de fosforescencia emitida.

2.3 PROCEDIMIENTO OPERATORIO.

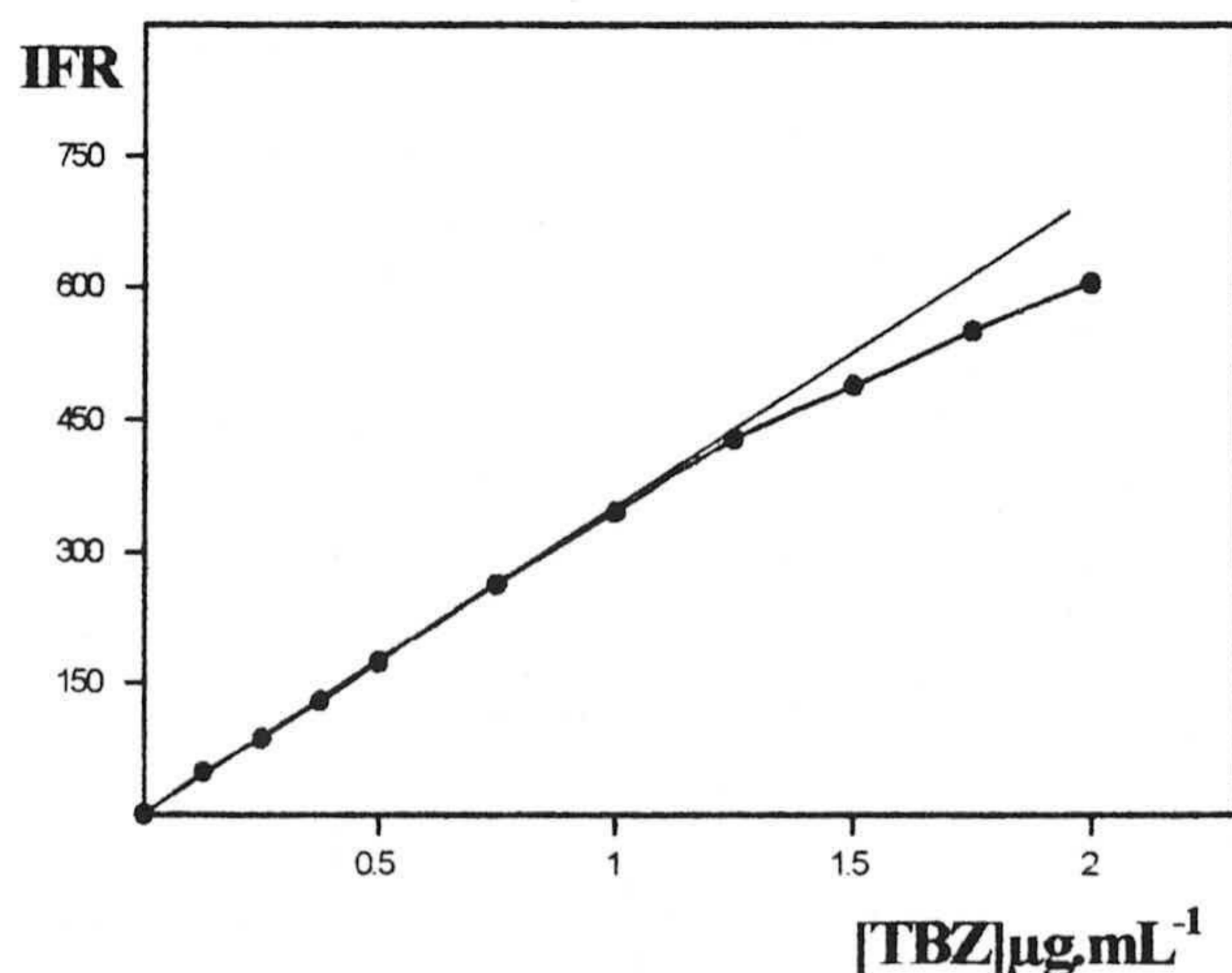
Una vez optimizadas las variables experimentales que afectan a la intensidad de fosforescencia emitida, podemos establecer el siguiente procedimiento operativo para la preparación de la muestra y condiciones de medida: sobre una tira de papel cromatográfico Whatman N° 4 de 45x12 mm se depositan, en este orden, dos gotas de disolución reguladora (acético/acetato de pH 4,1), 1,5 μ L de disolución saturada de $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ (1,1M) y 2,5 μ L de disolución de muestra. A continuación se seca la muestra mediante una corriente de aire caliente durante de un periodo de tiempo de tres minutos, se coloca entre dos láminas de cuarzo y se introduce en el compartimento de muestras del instrumento formando un ángulo de 45° con el haz de excitación, efectuándose las medidas de intensidad de fosforescencia transmitida a $\lambda_{\text{exc}} = 303$ nm; $\lambda_{\text{em}} = 473$ nm; $t_g = 12$ ms y $t_d = 0,1$ ms.

Resumen de los valores óptimos de las variables experimentales.

Variables	Valor óptimo	Variables	Valor óptimo
Soporte sólido	Papel de W ₄	λ_{exc}	303 nm
Metal pesado	Pb(II)	λ_{em}	473 nm
Concentración de Pb(II)	1,1M (saturada)	Rendija excitación	2,5 nm
Volumen de disolución de Pb(II)	1,5 μ L	Rendija emisión	5,0 nm
Volumen de la muestra	2,5 μ L	t_d	0,1 ms
pH	4,1	t_g	12 ms
Tiempo de secado	3 min	Ángulo incidencia	45°

2.4 ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE CONCENTRACIÓN Y SEÑAL ANALÍTICA.

Para conocer la relación existente entre la concentración de TBZ y la señal analítica y poder establecer la zona de linealidad, se realizó la siguiente experiencia: en matraces aforados de 25 mL de capacidad se introdujeron cantidades crecientes de disolución de TBZ de 10 mg·L⁻¹ de concentración y 2,5 mL de etanol absoluto enrasando con agua. De cada uno de estos matraces se prepararon tres muestras replicadas independientes, en la forma indicada en el apartado anterior, y se procedió a la lectura de sus respectivas emisiones fosforescentes, obteniéndose los datos que se resumen en la tabla 2.11 y se representan en la figura 2.11.

Figura 2.11. Influencia de la concentración de TBZ.**Tabla 2.11**

[TBZ] $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	IFR
0,000	0,00
0,125	48,67
0,250	86,83
0,375	129,28
0,500	173,67
0,750	262,33
1,000	345,33
1,250	427,80
1,500	488,67
1,750	551,23
2,000	604,90

De los resultados anteriores se deduce que existe una relación lineal entre intensidad de fosforescencia transmitida a temperatura ambiente y la concentración de TBZ hasta un valor máximo de $1,25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de TBZ

Para valores superiores de concentración la relación no es lineal ya que la desviación de la curva experimental respecto de la linealidad teórica es superior al 5%.

2.5 PARÁMETROS ANALÍTICOS.

2.5.1 Recta de calibrado

Para establecer la recta de calibrado, se preparó una serie de matraces aforados de 25 mL en los que se introdujeron cantidades crecientes de disolución patrón de TBZ de $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de concentración, las cantidades de etanol absoluto necesarias para mantener una proporción de alcohol del 10% y agua destilada hasta el enrase. A continuación, de cada una de estas disoluciones se prepararon tres muestras replicadas de acuerdo con el procedimiento previamente establecido y se midieron sus intensidades de fosforescencia en las condiciones anteriormente fijadas.

Figura 2.12. Recta de calibrado del TBZ.

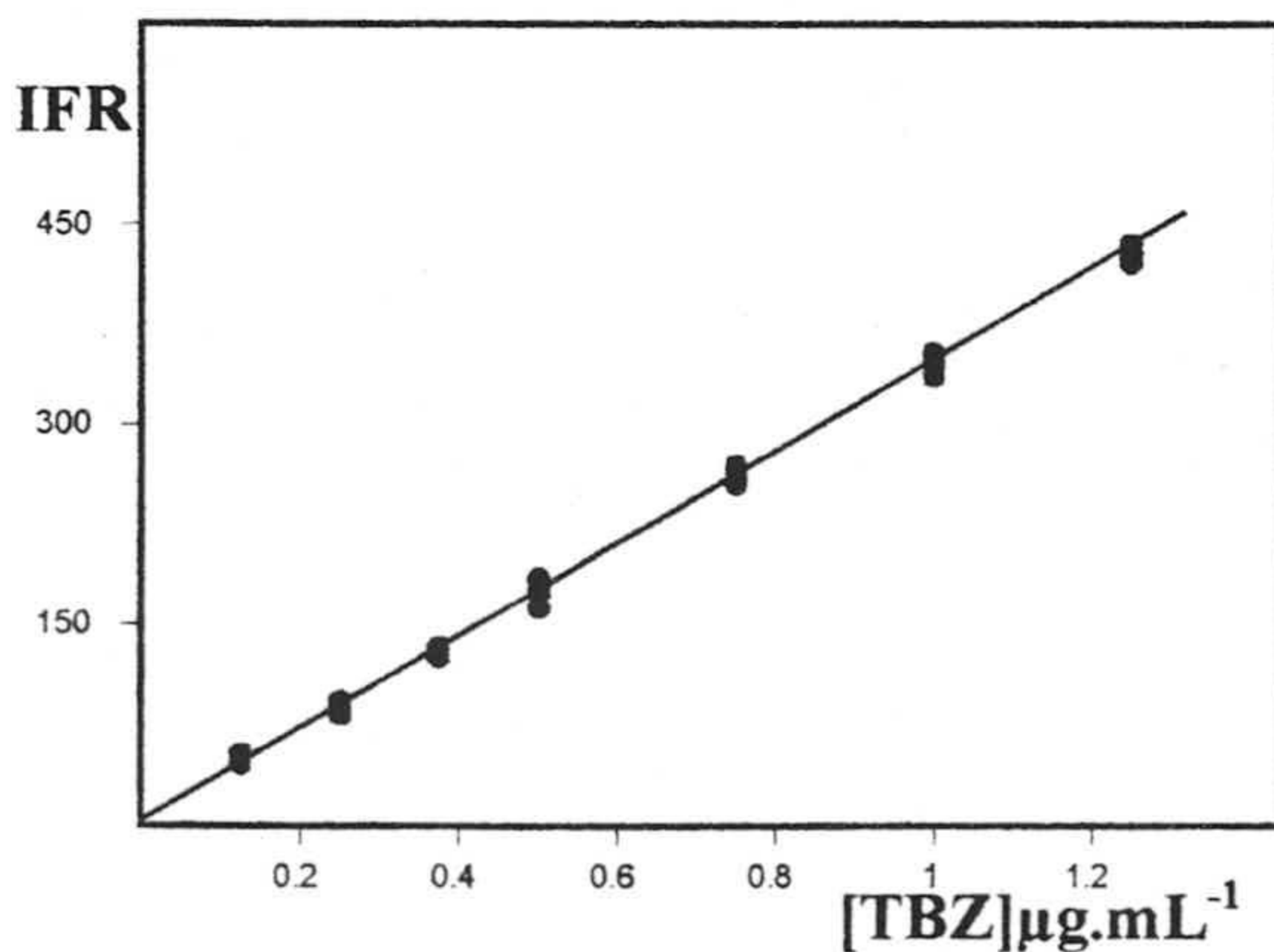


Tabla 2.12

[TBZ] ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	IFR (tres réplicas)		
0,125	48,00	53,00	45,00
0,250	92,00	82,00	86,50
0,375	129,75	125,30	132,80
0,500	175,00	184,00	162,00
0,750	255,00	263,00	269,00
1,000	336,00	354,00	346,00
1,250	435,50	420,60	427,30

Con los resultados experimentales obtenidos se confeccionó la tabla 2.12 y de ellos se obtuvo la recta de calibrado que representamos en la figura 2.12.

Mediante los procedimientos de cálculo estadístico reseñados en el capítulo 1 y utilizando el programa informático Statgraphics se obtuvieron los siguientes valores de los parámetros estadísticos del calibrado:

Tabla 2.13. Parámetros estadísticos del calibrado

Parámetro	Valor encontrado
n	21
m	3
a	3,827
b	340,50
S _a	2,689
S _b	3,753
S _{R,C}	3,585
P _{R,C} (lack of fit)	88,84
R ²	99,77

n: nº de muestras

m: nº de réplicas de cada muestra

a: Ordenada en el origen.

b: Pendiente

S_a: Desviación normal de la ordenada en el origen.

S_b: Desviación normal de la pendiente.

R: Coeficiente de correlación.

R²: Coeficiente de determinación.

S_{R,C}: Desviación normal de la regresión.

P_{R,C}: Nivel de significación del test de fallo de ajuste.

El test de fallo ajuste indica que hay un buen ajuste de los datos experimentales al modelo de regresión lineal ya que $p = 88,84 (> 5\%)$ para un nivel de confianza del 95%. Además, si representamos gráficamente los residuales frente a la concentración de TBZ se obtiene una distribución aleatoria de los residuales lo que es una prueba más del buen ajuste logrado con los datos de la recta de calibrado. En otras palabras podemos decir que el análisis de la varianza (ANOVA) en el intervalo lineal comprendido entre 0,125 y 1,250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ pone de manifiesto el buen ajuste lineal del modelo y la ausencia de curvatura.

Una vez comprobada la homoscedasticidad de los datos y admitiendo que se cumplen las hipótesis matemáticas del modelo de mínimos cuadrados (normalidad, aleatoriedad e independencia) se obtiene la siguiente función de calibrado:

$$\text{IFR} = 340,5[\text{TBZ}] + 3,83$$

donde [TBZ] está medida en $\mu\text{g.mL}^{-1}$, ecuación cuyos datos estadísticos del análisis de la varianza son los que incluimos en la siguiente tabla:

Resultados del ANOVA correspondiente a los datos experimentales.

Fuente	S.C	g.l	M.C	F _{exp}	P(%)
Modelo	352481,80	1	352481,8	8229,8	00000
Residuales	813,76831	19	42,82991		
Fallo de ajuste	85,103313	5	17,020663	0,32702	88,835
Error puro	728,66500	14	52,04750		

S.C: Suma de cuadrados.

M.C: Media de cuadrados.

2.5.2 Linealidad: $\text{Lin}(\%) = [1 - \text{DNR}(b)] 100 = [1 - 0,011]100 = 98.90 \%$

donde: $\text{DNR}(b) = s_b/b = 3,75/340,5 = 0,011 \mu\text{g.mL}^{-1}$

2.5.3 Sensibilidad: a) Sensibilidad de calibrado: $S_{\text{cal}} = b = 340,5 (\mu\text{g/mL})^{-1}$.

b) Sensibilidad analítica: $S_{\text{anal}} = s_{R,C}/b = 3,575/64,41 = 0,056 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

2.5.4 Límites de detección y cuantificación

El cálculo de los límites de detección y cuantificación se realizó siguiendo las normas de la IUPAC [15] mencionadas en el capítulo 1 de esta Memoria. Para ello se prepararon 10 disoluciones blanco contiendo todos los reactivos, excepto el analito, y siguiendo el procedimiento operatorio propuesto se midieron sus intensidades de fosforescencia transmitida y se obtuvieron los resultados que se resumen en la tabla 2.14.

Tabla 2.14. Repetibilidad del blanco.

Blanco N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
IFR	143,1	138,1	137,0	143,4	132,4	129,0	137,0	134,0	131,0	135,0

Con los datos de la anterior tabla se pueden calcular los siguientes parámetros:

Desviación normal del blanco: 4,76

Limite de detección: $LD = 0,024 \mu\text{g.mL}^{-1}$

Limite de cuantificación: $LQ = 0,079 \mu\text{g.mL}^{-1}$

2.5.5. Rango dinámico lineal

El intervalo de aplicación del método esta comprendido por tanto entre el límite inferior, para el que tomaremos el límite de cuantificación, y el límite superior que viene determinado por el valor superior que está dentro del intervalo lineal de concentraciones, calculado anteriormente mediante el test de fallo de ajuste. Por lo tanto:

$$RDL = 0,1 \frac{\text{Lim}_{\text{sup}}}{\text{Lim}_{\text{inf}}} = 0,1 (1,25/0,079) = 1,58$$

2.5.6 Precisión

La precisión se determinó mediante las dos formas establecidas en el capítulo 1, o sea:

a) Repetibilidad del método utilizando replicados de una muestra patrón.

Se prepararon 10 disolución de TBZ de $1,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de concentración y, siguiendo la metodología de trabajo establecida, se obtuvieron los resultados resumidos en la tabla 2.15, de donde se calcula una desviación normal $S_{n-1} = 5,68$ y una desviación normal relativa de $DNR = 1,63\%$.

Tabla 2.15. Repetibilidad del método usando replicados de muestras

Muestra N°	IFR	Muestra N°	IFR
1	341,60	6	354,40
2	348,80	7	352,80
3	344,00	8	345,80
4	350,40	9	356,00
5	349,60	10	338,40

b) Repetibilidad del método a partir de los datos del calibrado.

En la tabla 2.16 se indican los valores de la repetibilidad del método obtenidos en función de los datos del calibrado.

Figura 2.13.- Repetibilidad vs concentración de TBZ.

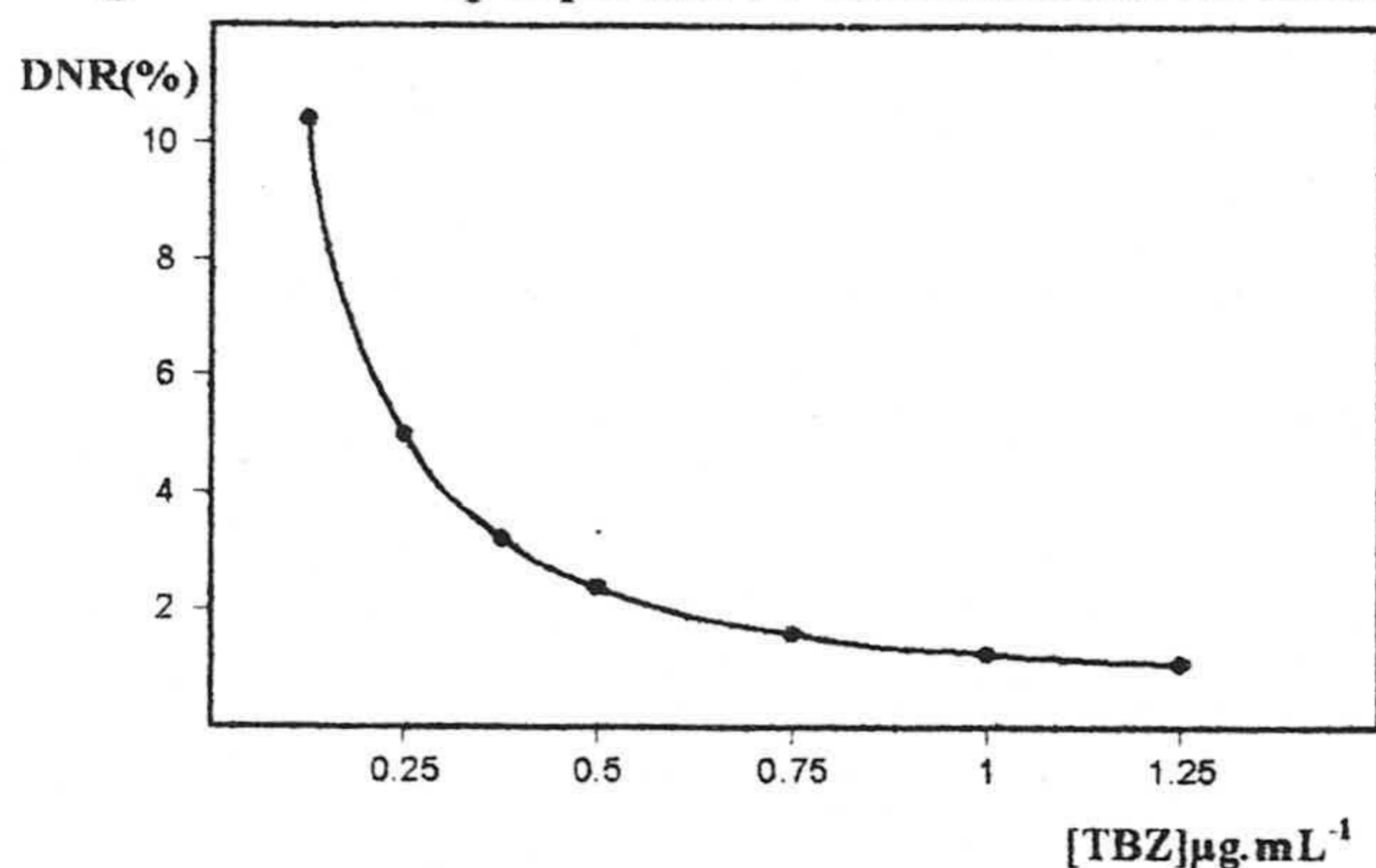


Tabla 2.16.

[TBZ] µg.mL ⁻¹	S _c	DNR (%)
0,125	0,0130	10,40
0,250	0,0125	5,00
0,375	0,0121	3,24
0,500	0,0119	2,38
0,750	0,0119	1,60
1,000	0,0126	1,26
1,250	0,0138	1,10

Como era de esperar, a medida que aumenta la concentración de TBZ analizada, la desviación estándar relativa se hace cada vez menor, ya que dividimos un valor prácticamente constante de desviación estándar entre un valor de concentración cada vez mayor.

En la tabla 2.17 se resumen los parámetros analíticos calculados mediante el método propuesto.

Tabla 2.17. Parámetros analíticos

Parámetros	Valor
RDL	1,58 µg.mL ⁻¹
Linealidad(%)	98,90
Sensibilidad calibrado	340,5 (µg/mL) ⁻¹
Sensibilidad analítica	0,056 µg.mL ⁻¹
LD	0,024 µg.mL ⁻¹
LQ	0,079 µg.mL ⁻¹
r ²	99,77
Fallo de ajuste	88,84

2.6 ESTUDIO DE INTERFERENCIAS.

A continuación se llevó a cabo el estudio de las interferencias que pueden causar la presencia de otros pesticidas, tanto fosforescentes como no fosforescentes y las especies iónicas más frecuentes en aguas, sobre la determinación del TBZ.

Para llevar a cabo esta experiencia se preparó una serie de matraces aforados de 25 mL para cada caso conteniendo $0,50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de TBZ y concentraciones crecientes de cada una de las especies interferentes y, utilizando la recta de calibrado, se determinó en cada caso el error relativo que origina la presencia de la especie interferente.

Hemos admitido como límite de tolerancia para la especie interferente, la concentración de esta que origina un error relativo superior al 5 %. No interfieren por tanto aquellas concentraciones de interferente que produzcan un error igual o inferior a este valor. Los resultados obtenidos están resumidos en la tabla 2.18.

Tabla 2.18 Niveles de tolerancia a especies extrañas.

Iónes y especies extrañas	Tolerancia ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
Diclon, Captan, Lindano, Folpet, Paraquat, Dicuat, Benomilo, Atrazina, Terbutrin, Ácido húmico, Morestan	>15 ó nivel saturación en agua.
Carbaril	< 2,0
1-Naftol	< 3,5
1-Fenilfenol	< 4,3
Warfarina	< 2,0
Carbendazima	< 15,0
F^- , Cl^- , Br^- , I^- y SO_4^{-2}	No interfieren
Li^+ , Na^+ , K^+ , y NH_4^+	> 100
Cu^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} y Ca^{+2}	No interfieren
Al^{+3} , Be^{+2} y NO_3^-	< 5,0
Fe^{+3} y PO_4^{-3}	< 2,0

2.7 APLICACIONES ANALÍTICAS

Para hacer un estudio de las posibles aplicaciones prácticas del método se eligieron como ejemplos más significativos algunas de las matrices reales en las que el pesticida puede estar presente, es decir, aguas naturales y verduras para las que está recomendado el uso de este compuesto durante su almacenamiento y transporte. Como ejemplo de estas últimas hemos seleccionado las siguientes: judías verdes, patata y lechuga.

2.7.1. Determinación de TBZ en aguas.

Se eligieron como casos representativos aguas de diferente procedencia como son: agua potable de la ciudad de Granada, agua del río Genil (Granada), agua del mar Mediterráneo (puerto de la ciudad de Motril) y aguas minerales de Fontdor, Lanjarón y Fontvella ya que son ejemplos de aguas potabilizadas, aguas naturales, agua de mar y aguas minerales. Afortunadamente, en ningún caso se detectó la presencia de TBZ en dichas aguas, o la cantidad presente de dicho pesticida era inferior al límite detectable por el método propuesto. Por ello, se efectuó un estudio de recuperación de TBZ en dichas aguas con objeto de comprobar el efecto matriz que pudieran causar las especies químicas presentes en dichas muestras reales. Excepto en el caso del agua de mar, en cuyo caso debido a las altas concentraciones de cloruro sódico hubo que someter el agua a un tratamiento previo de la muestra, en los restantes casos no se observó efecto matriz y fue suficiente el empleo de la recta de calibración normal mediante patrones externos.

2.7.1.1. Aguas minerales, de río y potable.

Para llevar a cabo este estudio, se realizó para todos los casos la siguiente experiencia: en tres matraces de 25 mL, se prepararon tres disoluciones de TBZ, de

las siguientes concentraciones: 1,0, 0,5 y 0,2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, añadiendo en cada caso la cantidad de etanol necesaria para mantener un porcentaje etanólico del 10% y enrasando hasta el volumen total con el agua problema correspondiente. A continuación se prepararon las correspondientes muestras, según el procedimiento descrito anteriormente y se efectuaron las medidas de fosforescencia en las condiciones habituales. En todos los casos se obtuvieron y midieron tres réplicas para cada tipo de muestra. Los valores de intensidad de fosforescencia se trasladaron a la recta de calibrado obtenida anteriormente a partir de los correspondientes patrones y se evaluó la concentración de analito recuperado de la correspondiente muestra. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 2.19.

Tabla 2.19. Recuperación de TBZ en aguas.

Agua de Lanjarón				Agua de Font Vella			
[TBZ]_p	[TBZ]_e	%Rec	% DNR	[TBZ]_p	[TBZ]_e	%Rec	% DNR
1000	965,0	96,5	2,8	1000	983,5	98,3	2,3
500	492,0	98,4	3,2	500	481,5	96,3	2,7
250	248,7	99,5	3,0	250	250,2	100,1	3,8

Agua de Fontdor				Agua del río Genil			
[TBZ]_p	[TBZ]_e	%Rec	% DNR	[TBZ]_p	[TBZ]_e	%Rec	% DNR
1000	1028,1	102,8	1,9	1000	986,4	98,6	2,3
500	502,1	100,4	2,7	500	480,5	96,1	1,8
250	244,7	97,8	3,1	250	255,5	102,2	3,1

Agua potable de Granada			
[TBZ]_p	[TBZ]_e	%Rec	% DNR
1000	1028,1	102,8	1,9
500	502,1	100,4	2,7
250	244,7	97,8	3,1

DNR: Desviación normal relativa
 [TBZ]_p: puesto. [TBZ]_e: encontrado en $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
 Rec: recuperado.

2.7.1.2 Aplicación al agua de mar

En el caso del agua de mar, a causa de la alta concentración de cloruro, se ha empleado como estrategia de calibrado la adición de patrón aunque también se ha

usado la recta de calibrado normal con objeto de comparar los resultados obtenidos. Ambos métodos de calibración se llevaron a cabo después del tratamiento del agua de mar que vamos a ver a continuación.

Tratamiento del agua de mar.

Con objeto de eliminar los cloruros del agua de mar, que precipitan en forma de PbCl_2 al añadir la disolución de metal pesado e impidiendo así la aparición de fosforescencia, se procedió a eliminar dichos cloruros mediante la adición previa de disolución saturada de $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ filtrando a continuación, a través de una membrana Millipore de $0,45\mu\text{m}$, para eliminar el precipitado formado. En el filtrado se comprobó la posible existencia de TBZ utilizando la recta de calibrado con patrones externos.

Recuperación en agua de mar.

Puesto que el método no detecta TBZ en esta muestra de agua y con objeto de comprobar su validez, se procedió a un estudio de recuperación mediante la recta de calibrado con patrones. Para ello se tomaron volúmenes conocidos (6 mL) de agua de mar y se les añadió la cantidad de disolución patrón de TBZ de $10,0\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ necesaria para obtener las siguientes concentraciones finales: 0,25; 0,50 y $1\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Las disoluciones se agitaron durante 1 min y, a continuación, se añadieron 13 mL de la disolución de $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ saturado para precipitar el cloruro. Tras separar el precipitado resultante, se aplicó el procedimiento analítico descrito anteriormente.

Tabla 2.20. Recuperación de TBZ en agua de mar.

$[\text{TBZ}]_p$	$[\text{TBZ}]_e$	R(m)%	DNR%
1,00	0,969	96,9	1,2
0,50	0,488	97,6	2,6
0,25	0,245	98,0	3,0

Los resultados obtenidos de las señales de fosforescencia transmitida se recogen en la tabla 2.20, donde $R(m)\%$ es el porcentaje de recuperación media de tres determinaciones independientes.

Calibrado con adición de patrón (AC y AC1)

Después de seguir el protocolo analítico de tratamiento de muestra como hemos visto anteriormente se aplicó el método de adición de patrón explicado en el capítulo 1, sobre dos muestras de agua de mar con objeto de saber si hay errores producidos por efecto de matriz. Esas dos muestras contienen concentraciones distintas de TBZ ($0,2$ y $0,4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

Aplicando el procedimiento general descrito se prepararon tres réplicas de cada muestra y se midió la señal analítica, obteniéndose los valores que resumen en las tablas 2.20 y 2.21, en las que las concentraciones de TBZ resultantes fueron respectivamente.

Tabla 2.20. Concentración de TBZ ($0,2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)

[TBZ] añadido	IFR (3 réplicas)			Media
0,000	68,6	75,3	65,2	69,7
0,50	150,3	147,0	148,0	148,4
0,500	238,0	242,6	235,3	238,6
0,800	342,7	335,2	333,4	337,1

Tabla 2.21. Concentración de TBZ ($0,4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)

[TBZ] añadido	IFR (3 réplicas)			Media
0,00	136,6	143,6	132,0	137,4
0,20	204,6	195,4	208,8	202,7
0,40	270,0	265,9	275,3	270,4
0,60	340,3	333,8	347,3	340,5

Calibrado de Youden

De acuerdo con lo que hemos explicado en el capítulo 1 sobre el calibrado de Youden se aplicó para llevar a cabo esta validación. Tras usar el procedimiento

operatorio ya descrito se midieron las intensidades de fosforescencia transmitida obteniéndose los resultados que resumen en la tabla 2.22.

Tabla 2.22: Calibrado de Youden.

[TBZ] $\mu\text{g mL}^{-1}$	IFR
0,10	35,9
0,20	68,3
0,30	102,0
0,40	135,0

Con los valores que figuran en las tablas 2.20; 2.21 y 2.22, podemos obtener los valores de los parámetros de calibración que figuran en la tabla 2.23 necesarios para validar el método protocolo de adición de patrón que figura en el capítulo 1 de esta Memoria.

Tabla 2.23. Valores numéricos de las parámetros correspondientes a las rectas de calibrado SC, AC y YC con agua de mar.

Parámetros	SC	AC	AC ₁	YC
n	21	12	12	4
a	3,83	67,99	136,31	2,55
b	340,5	336,7	338,31	331
S _{x,y}	6,54	4,48	5,60
r	0,999	0,9992	0,998	0,9999
P _{x,y}	88,8	20,0	81,56

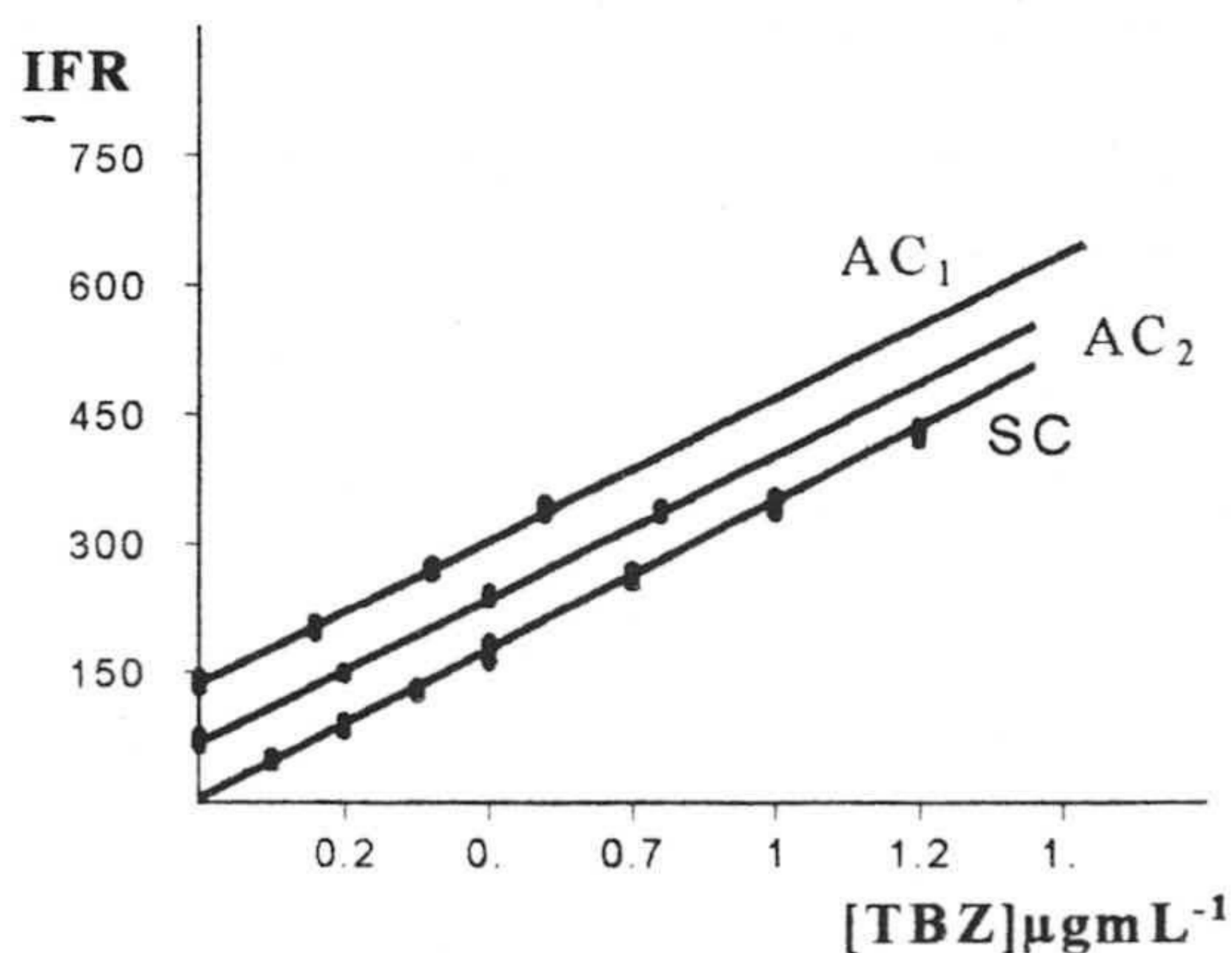


Figura 2.14 (a) Calibrado con patrones SC (b) Calibrado con adición de patrón AC (c) Calibrado con adición de patrón AC₁.

De los resultados obtenidos se observa que hay buen ajuste del modelo de regresión lineal para los tres calibrados, calibrado con patrones y los calibrados mediante adición de patrón ya que $P > 5\%$ para un nivel de confianza del 95 %.

A partir de estos datos se aplicó el procedimiento estadístico para llevar a cabo la validación del método analítico en la determinación del analito en agua de mar.

RESULTADOS DEL CRITERIO DE VALIDACIÓN POR ADICIÓN DE PATRÓN

Comparación de pendientes.

Los resultados del test de comprobación de las pendientes se resumen en la tabla 2.24.

Tabla. 2.24. Resultados de la comparación de los calibrados SC, AC y AC₁.

Parámetros	Valores
S_p	5,95
$S_p(1)$	6,26
$t(b)$	0,540(P = 59,32) valor critico 2,042(5%)
$t(b)_1$	0,231(P = 81,9) valor critico 2,042(5%)
b_p	339,4
$b_p(1)$	340,0
BY	-1,89
BY(1)	-1,53

Se comprobó que los valores del estadístico del test de Student $t(b)$ son menores que el valor t tabulado a un nivel de significación del 95% para $(n_{SC} + n_{AC} - 4)$, y $(n_{SC} + n_{AC1} - 4)$ grados de libertad, por tanto no hay diferencia significativa entre ambas pendientes en todos los casos. Por ello se puede estimar un valor promedio

b_p entre las pendientes de ambos calibrados para seguir con la validación del método:

Calculo de la ordenada en el origen. Blanco de Youden

Se pudieron calcular los nuevos valores de a' , a'_A y a_s las ordenadas en el origen para los calibrados AC, AC₁ y SC respectivamente y el intervalo de confianza del calibrado con patrones, mediante la utilización de los valores de pendiente promedio b_p , desviación estándar promedio s_p y t de Student con ($n_s - 2$) grados de libertad para un nivel de confianza del 95%. Los resultados obtenidos se recogen en la tabla 2.25.

Tabla.2.25 Nuevas ordenadas en el origen e intervalo de confianza sobre a_s .

Parámetros	SC	AC
a'	4,443	66,96
Intervalo de confianza sobre a_s	[-0,845; 9,31]	
a_y	2,55	
Parámetros	SC	AC1
a'	4,08	135,79
Intervalo de confianza sobre a_y	[-1,48; 9,64]	
a_y	2,55	

A vista de los resultados obtenidas en la tabla 2.25, se comprobó que el blanco de Youden del agua de mar está incluida en su correspondiente intervalo de confianza.

Comprobación de la exactitud.

Se llevó a cabo comparando el contenido en la muestra utilizando directamente la recta de calibrado con patrones y mediante el calibrado con adición de patrones. Esta comparación se efectuó mediante el cálculo del estadístico t(c). Los resultados obtenidas se resumen en la tabla 2.26.

Tabla 2.26 Comparación de la exactitud.

Parámetros	SC	AC
$C_{X,S}$	0,195
$C_{X,A}$	0,189
t(c)	0,762(P=45,2) valor critico 2,042(5%)	
Parámetros	SC	AC1
$C_{X,S}$	0,394
$C_{X,A}$	0,392
t(c)	0,356(P=72,44) valor critico 2,042 (5%)	

A partir de los resultados obtenidos en la tabla anterior se observó que no existe discrepancia entre los resultados. Mediante la comparación pudieron concluir que no hay diferencia significativa entre los contenidos calculados. Ya que $t(c)_{cal} < t(c)_{tab}$ para $(n_{SC} + n_{AC} - 3)$ grado de libertad, acepta que el método es exacto con un valor P mayor del 5% a un nivel de confianza del 95%.

2.7.2. Determinación de TBZ en productos vegetales.

El método propuesto ha sido aplicado a la determinación de TBZ en tres productos vegetales (patata, judía verde y lechuga).

Determinación de TBZ en patatas:

El procedimiento operatorio se llevó a cabo con una serie de muestras de patatas de diferente tamaño mezcladas con diferentes niveles de concentraciones de TBZ.

Para ello, se tomaron muestra de 100 g de patata picada (con cáscara) y a continuación se tomaron muestras de tres tamaños distintos, 5, 10 y 20 g. Dichas muestras se introdujeron en una serie de vasos de precipitado, y se añadieron cantidades de TBZ a tres niveles de concentración distintos. Se situaron en un baño de ultrasonidos durante tres minutos hasta que la muestra quedó homogeneizada, a

continuación en cada vaso se pusieron 40 mL de acetato de etilo, se agitó durante 2 minutos a 700 r.p.m, y se filtró a vacío a través de una membrana Millipore N° 3 de 0,45µm. La pulpa resultante se pasó de nuevo al mismo vaso y se pusieron otros 40 ml de acetato de etilo repitiéndose el proceso. A continuación se añadieron 25 mL de acetato de etilo sobre la pulpa de patata, se filtró otra vez a vacío a través de una membrana Millipore N° 4, y el filtrado se transfirió a un matraz esférico de 250 mL de un rotavapor que se evaporó todo el disolvente. El residuo sólido resultante se disolvió con 5 mL de etanol absoluto. Este volumen se transfirió a un matraz aforado de 50 mL y se enrasó agua/etanol (9/1 v/v). Con esta disolución se prepararon las muestras analíticas, de acuerdo con el procedimiento ya descrito. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 2.28.

Tabla.2.28 Estudio la recuperación de TBZ en muestras de patata

Patata			
Tamaño de muestra (g)	C añadida mg.Kg ⁻¹	C encontrada mg.Kg ⁻¹	R (%)
5	1,00	0,979	97,9
	0,50	0,480	96,0
	0,25	0,247	99,8
10	1,00	0,989	98,9
	0,50	0,489	97,8
	0,25	0,247	98,8
20	1,00	0,990	99,0
	0,50	0,493	0,985
	0,25	0,249	99,7

Aplicación del criterio de validación de Doerffel a las muestras de patata

Aplicando el creterio de validación de K. Doerffel [12,13] obtenemos los resultados que figuran en la tabla 3.37 en donde podemos apreciar que encontramos recuperaciones medias en todos los casos no significativamente distintas del 100%, ya que el valor de t calculado es inferior al t tabulado para un nivel de con-

fianza de 95%. Por lo tanto el método es aplicable a la determinación de tiabendazol en patata con un límite de detección, $LD = 0,024 \text{ mg.Kg}^{-1}$ y de determinación de $LQ = 0,079 \text{ mg.Kg}^{-1}$

Para posteriores experiencias se ha fijado el tamaño de muestra en 10 g para todos los productos alimenticios utilizados en las aplicaciones.

Tabla.2.29. Comprobación de la validez del método para las muestras de patata.

Tamaño de muestra (g)	Parámetros	Valores calculados
5	\bar{R}	97,68
	S_R	2,74
	t (cal)	2,07 ($t_{\text{tab}} = 2,571$)
	P	9,32
10	\bar{R}	98,37 %
	S_R	2,00
	t (cal)	2,00 ($t_{\text{tab}} = 2,571$)
	P	10,2
20	\bar{R}	98,77
	S_R	2,84
	t (cal)	1,06 ($t_{\text{tab}} = 2,571$)
	P	33,76

Determinación de TBZ en lechuga y judia verde.

Una vez picada una cantidad suficiente de vegetal, se tomaron muestras de 10 g y se aplica el mismo procedimiento operatorio utilizada anteriormente en el análisis de patata. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 2.28.

Tabla.2.28 Estudio la recuperación de TBZ en muestras de en lechuga y judía verde.

Lechuga		
Concentración añadida mg.Kg ⁻¹	Concentración encontrada mg.Kg ⁻¹	σ_{n-1}
1	0,986	(0,023)
0,50	0,494	(0,019)
0,25	0,246	(0,006)
Judía Verde		
Concentración añadida mg.Kg ⁻¹	Concentración encontrada mg.Kg ⁻¹	σ_{n-1}
1,00	0,995	(0,032)
0,50	0,488	(0,022)
0,25	0,237	(0,007)

Los valores entre los paréntesis son las desviaciones estándares de tres réplicas.

2.8 VALIDACIÓN DEL MÉTODO PROPUESTO MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN.

Para comprobar la exactitud y la validez de los resultados obtenidos mediante el método propuesto, se compararon estos resultados con los resultados obtenidos con el método de cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), establecido por Dilna, Hall, Shamis, y Whitlock [14], que se utilizó como método de referencia.

Comparación de los resultados

Una vez obtenidos los resultados mediante nuestro método y mediante el de referencia CLAR procedimos a la comparación de los resultados obtenidos por ambos métodos. La comparación se hizo aplicando el método estadístico descrito en el capítulo 1 de la presente Memoria, según el cual en primer lugar se comparan las varianzas de los resultados del contenido de pesticida obtenido por ambos métodos y si no hay diferencias significativas entre ambos, o sea $P > 5\%$, se calcula una varianza promedio. Se hay diferencias se calculan los grados de libertad teóricos mediante la aplicación del test de Welch.

Tabla 2.32. Comparación de los resultados obtenidos mediante espectrometría de fosforescencia en fase sólida a temperatura ambiente con los obtenidos mediante cromatografía líquida de alta resolución para TBZ.

Agua mineral de Lanjarón.			Agua mineral de FontVella.		
Parámetro	CLAR	EFS	Parámetro	CLAR	EFS
n	3	3	n	3	3
\bar{c} mg.L ⁻¹	0,970	0,965	\bar{c} mg.L ⁻¹	0,981	0,984
S _{n-1}	0,0310	0,0272	S _{n-1}	0,029	0,026
t	0,32 (P = 76,5%)		t	0,2 (P = 85,1%)	

Agua mineral de Fontdor.			Agua potable de Granada		
Parámetro	CLAR	EFS	Parámetro	CLAR	EFS
n	3	3	n	3	3
\bar{c} mg.L ⁻¹	0,999	1,028	\bar{c} mg.L ⁻¹	0,960	0,968
S _{n-1}	0,025	0,030	S _{n-1}	0,033	0,024
t	1,063 (P=34,77%)		t	0,580 (P = 59,3%)	

Agua del Río Genil (Granada)			Agua de mar (Motril).		
Parámetro	CLAR	EFS	Parámetro	CLAR	EFS
n	3	3	n	3	3
\bar{c} mg.L ⁻¹	0,990	0,992	\bar{c} mg.L ⁻¹	0,970	0,966
S _{n-1}	0,023	0,025	S _{n-1}	0,030	0,031
t	0,139 (P = 89,6%)		t	0,223 (P = 83,4%)	

Judía verde.			Lechuga.		
Parámetro	CLAR	EFS	Parámetro	CLAR	EFS
n	3	3	n	3	3
\bar{c} mg.L ⁻¹	1,000	0,996	\bar{c} mg.L ⁻¹	0,989	0,972
S _{n-1}	0,038	0,032	S _{n-1}	0,024	0,021
t	0,217 (P = 83,9%)		t	1,402 (P = 23,35%)	

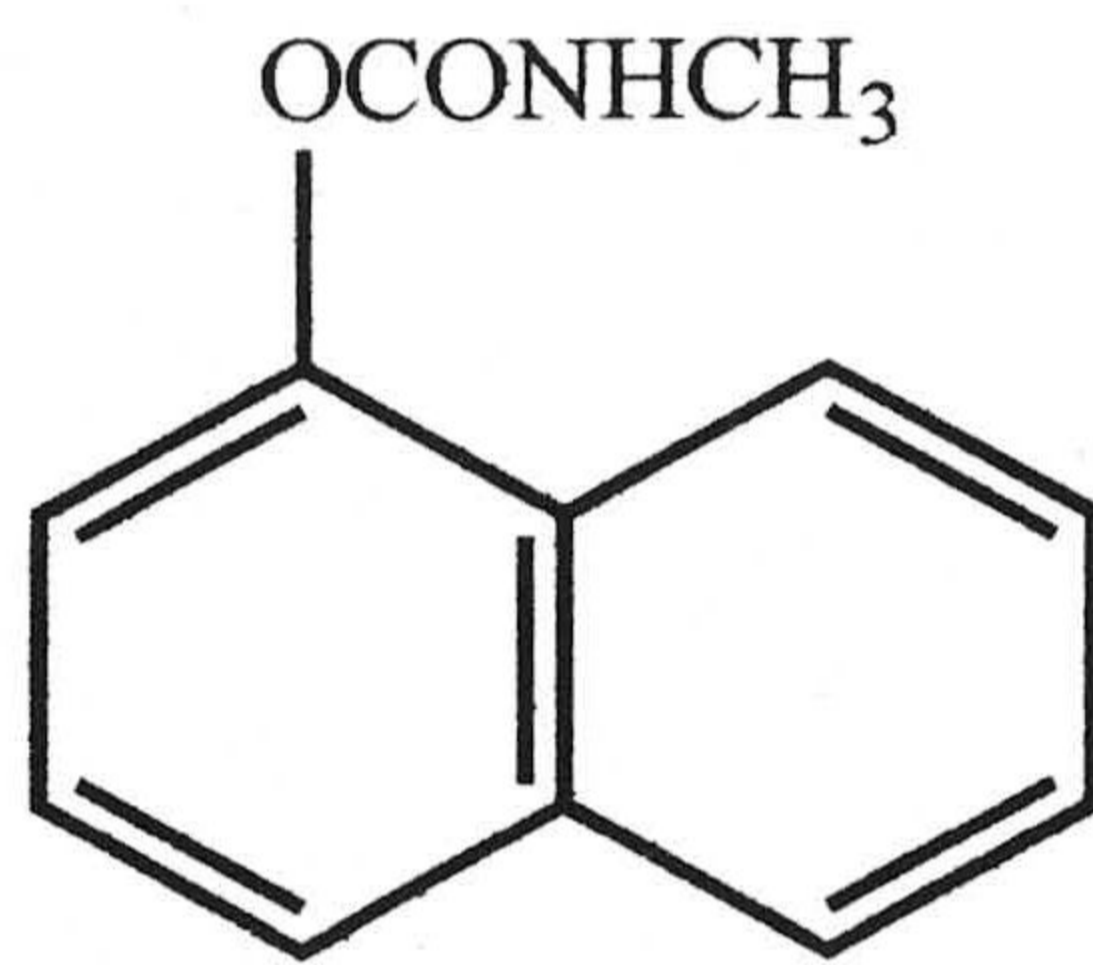
Patata		
Parámetro	CLAR	EFS
n	3	3
\bar{c} mg/l	0,978	0,981
S _{n-1}	0,026	0,031
t	0,170 (P = 87,3%)	

Podemos concluir que el método propuesto para la determinación de tiabendazol mediante fosforescencia a temperatura ambiente sobre papel da resultados exactos y precisos, siendo además simple en su realización que era uno de los objetivos buscando en esta Memoria.

Como resultado de los estudios realizados se ha publicado un artículo denominado: Determination of Thiabendazole in Foods and Water by Solid-Phase Transmitted Room - Temperature Phosphorescence (L. F. Capitán-Vallvey, M. K. Deheidel, and Ramiro Avidad, *Mikrochim. Acta* 130, 273-279 (1999), del que hemos incluido una copia en el Apéndice nº 1 de esta Memoria.

Bibliografía

1. E.M. Schulman y R.T. Parker, *J. Phys. Chem.*, Vol. N° 20, 1932, (1977).
2. J.J. Aaron y J.D. Winefordner, *Analisis.*, 7, 168, (1979).
3. J.J. Vanelli y E.M. Schulman, *Anal. Chem.*, 56, 1030, (1984).
4. G.F. Kirkbright y E.S. Shaw, *Can. J. Spectrosc.*, 28, 100, (1983).
5. S.Y.Su, E.B. Asafu-Adjaye y S. Ocak, *Analyst*, 109, 1019, (1984).
6. G.C. De Lima, M.M. Andino y J.D. Winefordner, *Anal. Chem.*, 58, 2867, (1986).
7. A.D. Campiglia, G.C. De Lima, *Anal. Chem*, 59, 2822, (1987).
8. W. Watts, A. Pal, L. Ford, G.H. Miller, T. Vo-Dinh, D. Eastwood y R. Lidberg, *Appl. Spectrosc.*, 46, N° 8, 1235 (1992).
9. T. Vo-Dinh, *Room Temperature Phosphorimetry for Chemical Analysis*, Wiley, New York, (1984).
10. R.J. Hurtubise, *Phosphorimetry: Theory, Instrumentation and Application*, VCH Publisher Inc., New York., (1990).
11. S.W. Tjie y R.J. Hurtubise, *Talanta.*, 42, 971,(1995).
12. K. Doerffel, *Fresenius J. Anal. Chem.*,183,348(1994).
13. K. Doerffel, Analytical Methods Committee, *Analyst.*, 29,120(1995).
14. M.V. Dilna, R.E. Hall, J.D. Shamis y S.A. Whitlock, *J.Chromatogr.*, 283, 383 (1984).
15. Nomenclature, Symbols, Units and their usage en spectrochemical Analysis II, *Spectrochim. Acta (B).*,242 (1978).



CAPÍTULO 3

ESTUDIO DEL CARBARIL MEDIANTE
ESPECTROFOSFORIMETRÍA EN FASE SÓLIDA

ÍNDICE DEL CAPÍTULO

3.1	CARACTERÍSTICAS FOSFORESCENTES DEL CARBARIL	191
3.1.1	Espectro de luminiscencia del CBL en fase sólida	192
3.1.2	Espectros bidimensionales del CBL en fase sólida	194
3.2	OPTIMIZACIÓN DE LAS VARIABLES EXPERIMENTALES	195
3.2.1	Optimización de variables experimentales de la muestra	196
3.2.1.1	<i>Elección del soporte sólido</i>	196
3.2.1.2	<i>Selección del átomo pesado</i>	197
3.2.1.3	<i>Influencia de la concentración de átomo pesado</i>	197
3.2.1.4	<i>Influencia del volumen de disolución de átomo pesado</i>	199
3.2.1.5	<i>Influencia del uso de láminas de cuarzo</i>	200
3.2.1.6	<i>Influencia del pH</i>	201
3.2.1.7	<i>Influencia de la fuerza iónica</i>	203
3.2.1.8	<i>Influencia del volumen de muestra</i>	204
3.2.1.9	<i>Influencia del tiempo de secado</i>	204
3.2.2	Optimización de variables instrumentales	206
3.2.2.1	<i>Rendijas de excitación y emisión</i>	206
3.2.2.2	<i>Tiempos de retraso y lectura del detector</i>	207
3.3	PROCEDIMIENTO OPERATORIO	207
3.4	ESTUDIO DE RELACIÓN ENTRE CONCENTRACIÓN Y SEÑAL ANALÍTICA	207
3.5	PARÁMETROS ANALÍTICOS	209
3.5.1	Recta de calibrado	209
3.5.2	Linealidad	211
3.5.3	Sensibilidad	211
3.5.4	Límites de detección y cuantificación	211
3.5.5	Rango dinámico lineal	212
3.5.6	Precisión	212
3.6	ESTUDIO DE INTERFERENCIAS	213
3.7	APLICACIONES ANALÍTICAS	214
3.7.1	Determinación de CBL en aguas	215
3.7.1.1	<i>Aguas minerales, del río Genil y potable</i>	215
3.7.1.2	<i>Agua de mar</i>	216
3.7.2	Determinación de CBL en productos agrícolas	217
3.7.2.1	<i>Determinación de CBL en patatas</i>	218
3.7.2.2	<i>Determinación de CBL en arroz y trigo</i>	219
3.8	VALIDACIÓN DEL MÉTODO PROPUESTO MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN	220
	BIBLIOGRAFÍA	222

En los últimos años los insecticidas organoclorados, a pesar de su extraordinaria eficacia, dada su persistencia y el peligro que entrañan para los seres vivos incluido el hombre, van siendo sustituido gradualmente por organofosforados y carbamatos que son productos fácilmente degradables.

Uno de los carbamatos más utilizadas hoy día es el 1-naftil-N-metilcarbamato comúnmente llamado carbaril (CBL), un pesticida de contacto que posee unas propiedades excelentes como insecticida ya que su uso nos permite el control de la gran mayoría de las plagas de insectos que afectan a las cosechas de frutas, verduras y cultivos agrícolas en general.

Por todo ello, además de por su baja toxicidad para las plantas, es uno de los plaguicidas más usados en todo el mundo. Al igual que la mayoría de los insecticidas carbámicos, presenta efectos nocivos para el hombre, habiéndose observado efectos embriotóxicos, teratogénicos, mutagénicos y carcinogénicos en estudios realizados con ratas de laboratorio. De ahí que su control y determinación en agua, frutas y verduras, a concentración de trazas, sea de gran importancia.

3.1. CARACTERÍSTICAS FOSFORESCENTES DEL CARBARIL

Con objeto de estudiar la posibilidad de determinar CBL mediante espectrofotofluorimetría a temperatura ambiente se han obtenido en primer lugar sus espectros de luminiscencia total. La obtención de estos espectros ha sido posible, gracias a la conexión RS-232C, establecida entre el espectrofluorímetro y un ordenador tipo PC que dispone de un programa de recogida y tratamiento de datos (FLDM) y de un programa de representación tridimensional (Golden Surfer).

Para ello se registraron una serie de espectros de emisión con un incremento de λ_{exc} constante y se transformaron en un fichero de formato GRD compa-

tible con Golden Surfer mediante un programa PASCAL, archivándose a continuación para su representación y posterior tratamiento de datos.

3.1.1. Espectro de luminiscencia total del CBL en fase sólida.

Con objeto de obtener el espectro de fosforescencia total del CBL en fase sólida a temperatura ambiente, se utilizó papel cromatográfico Whatman nº4 (W4) como soporte sólido y se empleó el siguiente método operatorio: sobre el soporte sólido se depositaron 10 μL de disolución 0,36 M de TlNO_3 , y 2,5 μL de disolución hidroalcohólica (10/90 v/v etanol/agua) de CBL de 2,0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de concentración, a continuación se secó la muestra mediante aire caliente producido por un secador de pelo doméstico, hasta que la muestra quedó totalmente seca. Se colocó la muestra entre dos láminas de cuarzo de 4,5x1x0,1 cm y se registraron los espectros de fosforescencia total bajo las siguientes condiciones instrumentales: $t_g = 0,1$ ms, $t_d = 12$; intervalo de longitud de onda excitación: 250-350 nm; intervalo de longitud de onda emisión: 450-560 nm; espaciado entre barridos: 3 nm; rendija de excitación: 2,5 nm; rendija de emisión: 5,0 nm y velocidad de barrido: 240 $\text{nm}\cdot\text{min}^{-1}$.

En la figura 3.1 se muestra el espectro obtenido, visto desde cuatro ángulos diferentes, después de restar la contribución del blanco. Como se puede apreciar en la citada figura, el CBL en fase sólida, presenta dos máximos de emisión fosforescente situados a 486 y 520 nm de longitud de onda de emisión y 282 nm de longitud de onda de excitación.

Mediante el programa informático Golden Surfer, anteriormente citado, los datos del espectro tridimensional pueden ser manipulados de forma que, uniendo los puntos de igual intensidad de emisión fosforescente, resultan las curvas de nivel

que podemos ver en la figura 3.2, en las que aprecia con claridad la situación del máximo espectral.

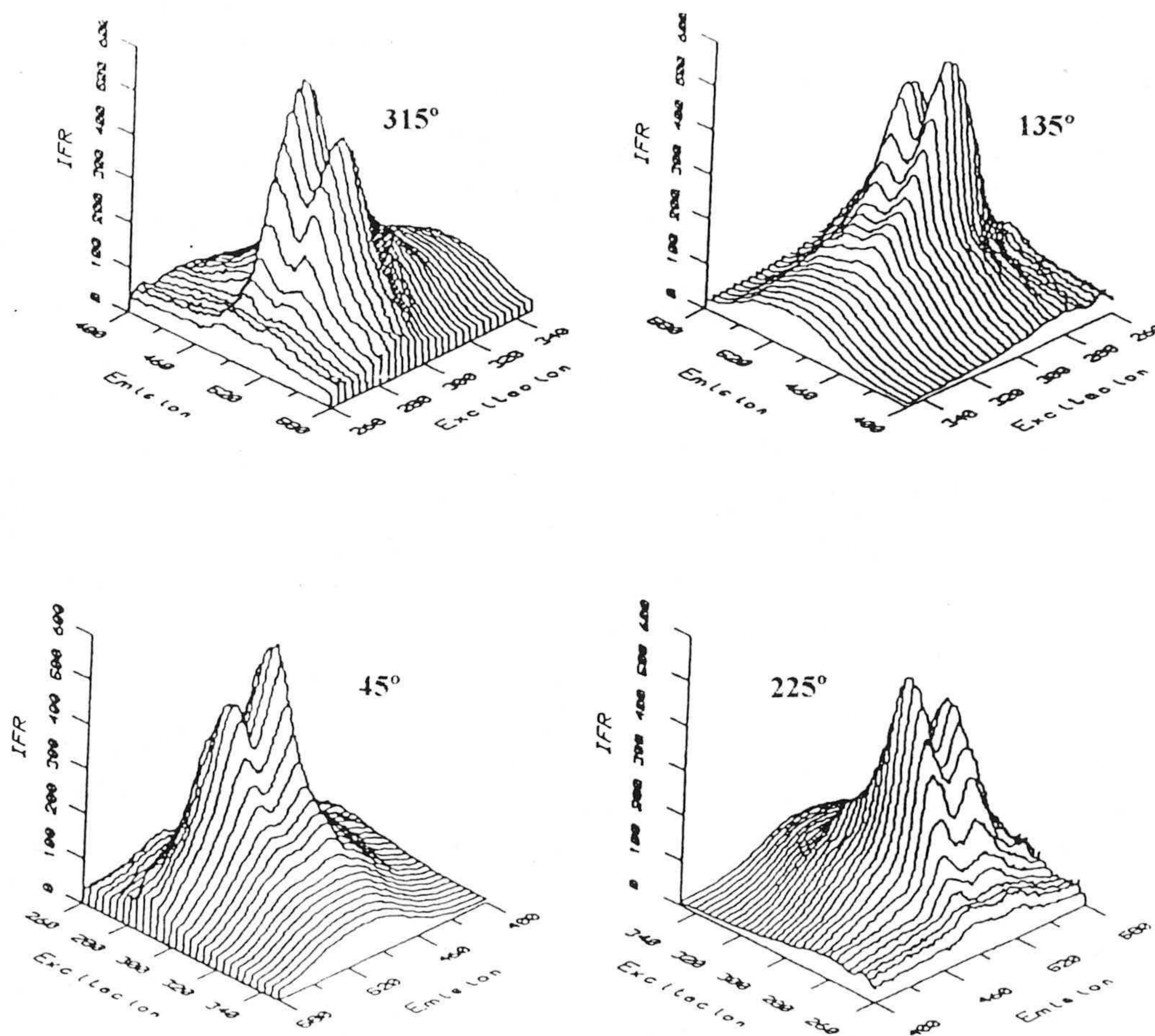


Figura 3.1 Espectros de fosforescencia total del CBL ($2\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

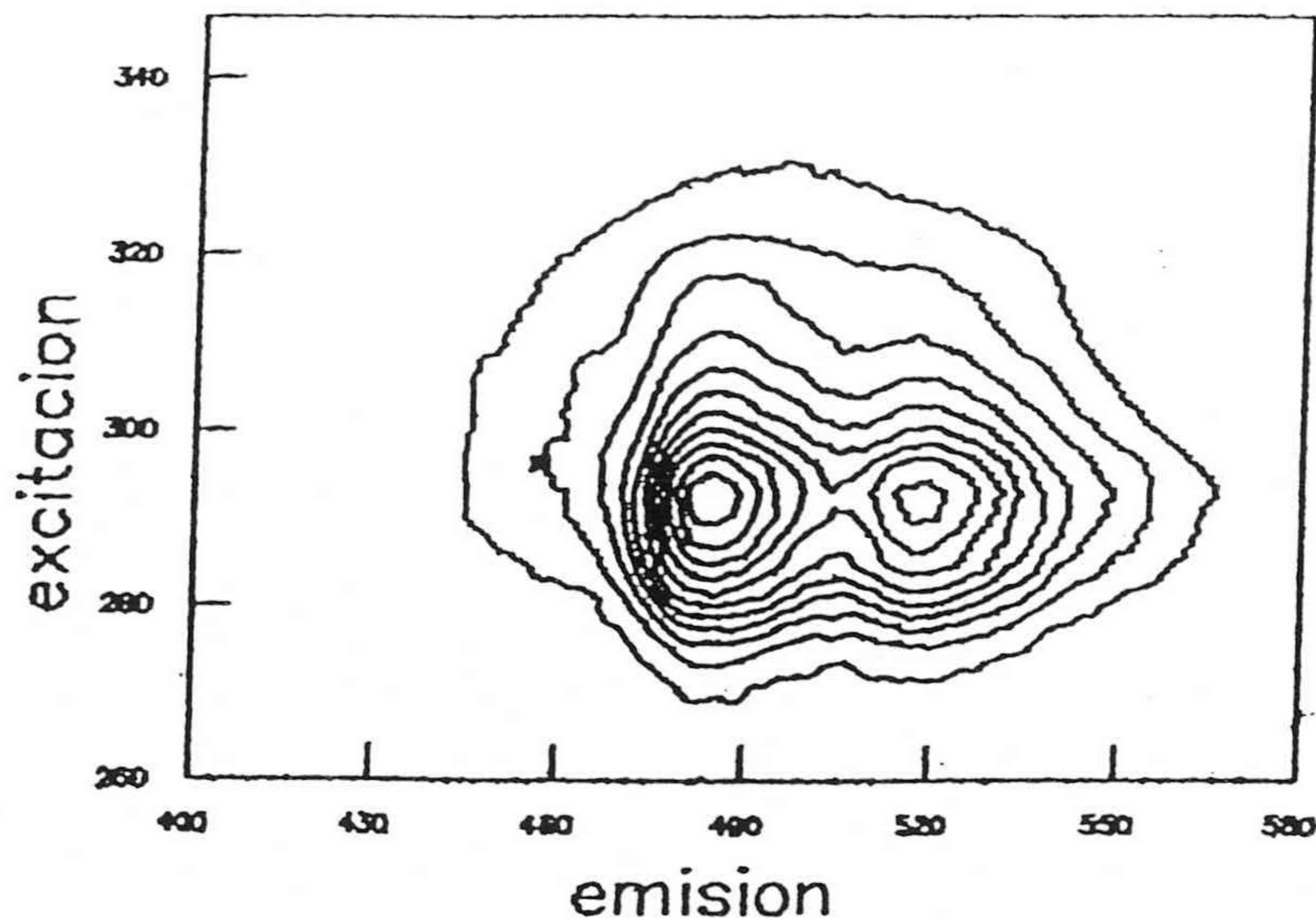


Figura 3.2. Curvas de nivel del CBL en fase sólida

3.1.2. Espectros bidimensionales del CBL en fase sólida

Conocida la posición del máximo espectral, obtenida a partir del topograma de la figura 3.2, se procedió a registrar los espectros bidimensionales de excitación y emisión del CBL en fase sólida para facilitar la optimización de las diferentes variables experimentales que afectan a la emisión fosforescente. Para ello, se preparó la muestra de la forma descrita anteriormente y los espectros se registraron bajo las siguientes condiciones instrumentales: para el espectro de excitación la longitud de onda de emisión fue 486 nm, registrándose el espectro entre 250 nm y 330 nm de excitación y para el espectro de emisión la longitud de onda de excitación fue 282 nm registrándose el espectro entre 450 nm y 550 nm. En ambos casos $t_d = 0,1$ ms, $t_g = 12$ ms, rendijas de excitación y de emisión 2,5 y 5 nm respectivamente y velo-

cidad de barrido = $240 \text{ nm}\cdot\text{min}^{-1}$. Los espectros obtenidos los podemos observar en la figura 3.3.

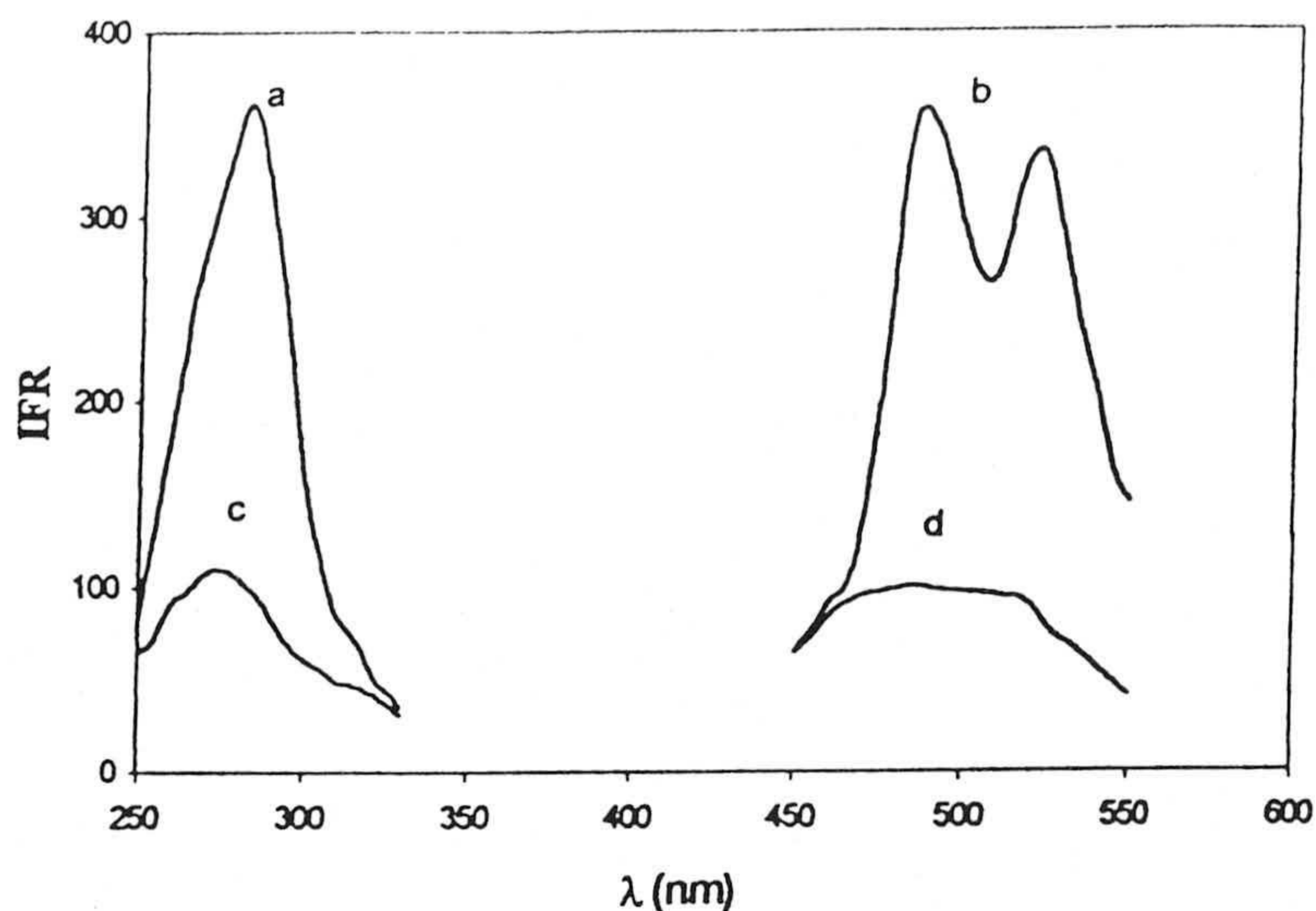
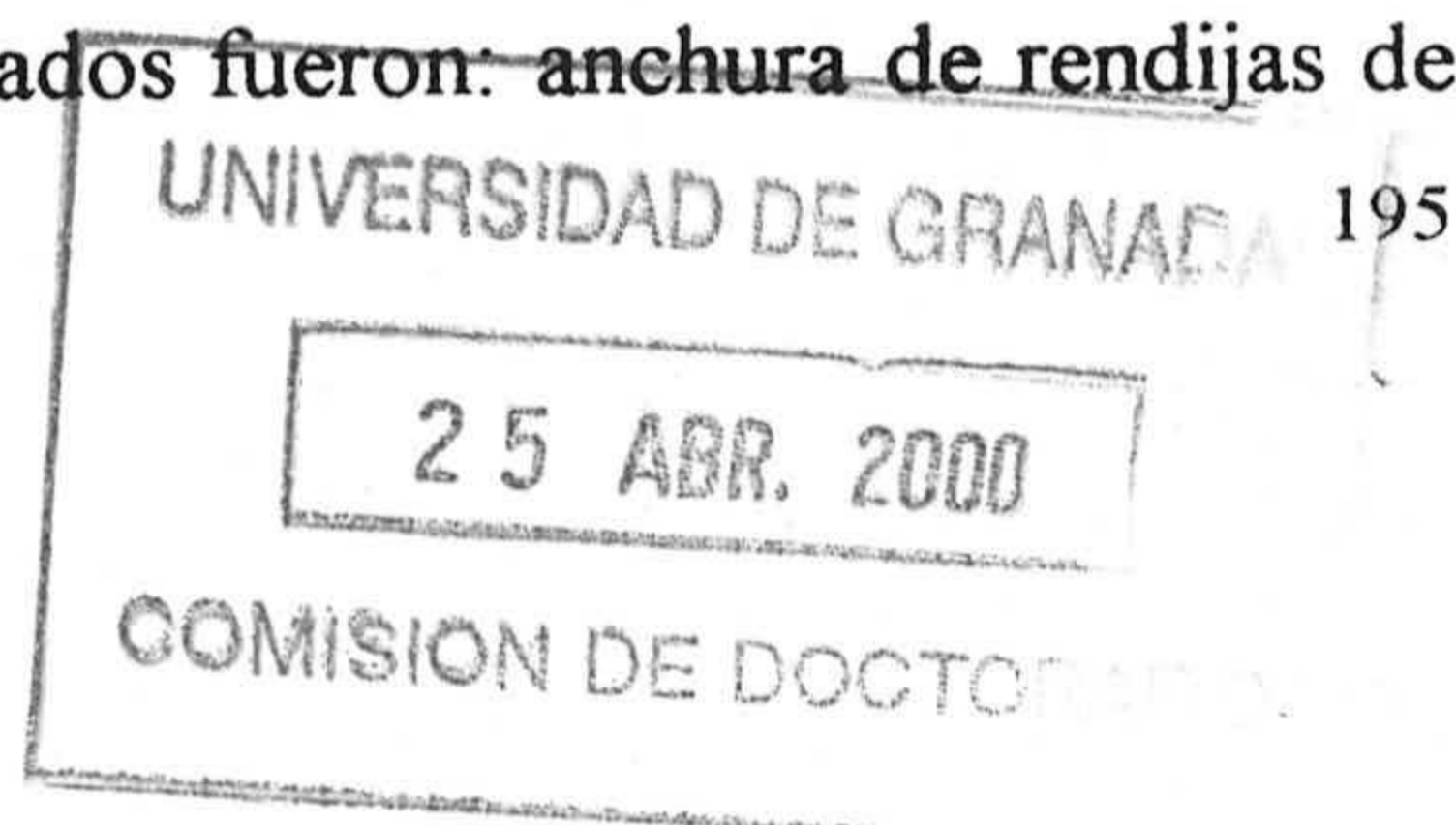


Figura 3.3. Espectros de excitación y emisión (a,b) de la muestra del CBL (c,d) del blanco en papel cromatográfico W4

3.2 OPTIMIZACIÓN DE LAS VARIABLES EXPERIMENTALES.

La optimización de cada una de las variables, tanto de la muestra como instrumentales, se llevó a cabo manteniendo constantes los valores de todas ellas, excepto el de aquella variable que se deseaba estudiar, estableciendo entonces su influencia sobre la intensidad de fosforescencia emitida por el analito. Procediendo de esta forma se estudiaron las siguientes variables experimentales: influencia de la naturaleza del soporte sólido, volumen y concentración del átomo pesado, influencia del oxígeno y de la humedad atmosféricos, pH del medio y fuerza iónica del mismo, volumen de muestra depositada en el soporte sólido, tiempo de secado de la muestra. Las variables instrumentales estudiados fueron: anchura de rendijas de



excitación y emisión y tiempos de lectura (t_g) y de retraso en la apertura del detector (t_d).

3.2.1. Optimización de las variables experimentales de la muestra.

Una vez comprobada la emisión fosforescente del CBL, se procedió al estudio sistemático que nos conducirá a la optimización de las variables experimentales implicadas en la preparación de la muestra que influyen en el proceso de emisión fosforescente.

3.2.1.1. Elección del soporte sólido

Para elegir el soporte sólido más adecuado se seleccionaron, a priori, los siguientes tipos de papel: papel cromatográfico Whatman N° 4, papeles cromatográficos de cambio iónico Whatman P-81(catiónico) y DE-81(aniónico) y papel de filtro Albet N° 1305. La forma de proceder para la preparación de las muestras fue la misma en todos los casos e igual a la descrita en los apartados anteriores, preparándose en cada caso el correspondiente blanco. Los datos obtenidos se recogen en la tabla 3.1.

Tabla.3.1. Influencia de la naturaleza del soporte sólido sobre la intensidad de fosforescencia.

Tipo de soporte	IF(muestra)	IF(blanco)	ΔIF
Papel Whatman n° 4	440	88	352
Papel Whatman P-81	273	195	78
Papel Whatman DE-81	376	226	150
Papel Albet n° 1305	440	290	200

Los valores de intensidad de fosforescencia (IF) que figuran en esta tabla, son la media de tres determinaciones diferentes.

De los resultados que resumen en la tabla 3.1 se puede concluir que el papel cromatográfico Whatman n° 4 es el que, en igualdad de condiciones, favorece

la aparición de una mayor intensidad fosforescente relativa, razón por la cual se eligió como soporte sólido para posteriores experiencias.

3.2.1.2. Selección del átomo pesado

En el caso del CBL se ensayaron una serie de metales pesados en formas de nitratos y acetatos, así como varios aniones voluminosos. Las especies químicas ensayadas fueron las siguientes: Pb(II), Ag(I), Tl(I), y Hg(II) como cationes y halogenuros como aniones. Los resultados obtenidos son los que se incluyen en la tabla 3.2.

Tabla 3.2. Influencia del átomo pesado sobre la IF del CBL.

Metal	IFR	DNR%	Halogenuro	IFR	DNR%
Pb(II)	278	2,7	I⁻	282	2,1
Tl(I)	355	2,1	Br⁻	85	3,1
Hg(II)	12	3,2	Cl⁻	24	4,2
Ag(I)	10	4,2	F⁻	19	3,9

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la tabla anterior se decidió utilizar Tl(I), en forma de nitrato, como metal pesado más adecuado para incrementar la emisión de fosforescencia en futuras experiencias, ya que se consiguen valores de intensidad de fosforescencia relativa superiores a los obtenidos con cualquiera otra de las sales ensayadas. Paralelamente se puede comprobar que el incremento de intensidad de fosforescencia producido por la presencia de halogenuros, aumenta con el volumen del ion utilizado en el siguiente orden: F⁻ < Cl⁻ < Br⁻ < I⁻ como ya se vio en el caso del tiabendazol estudiado en el capítulo precedente.

3.2.1.3. Influencia de la concentración de la disolución de metal pesado.

Una vez elegido el Tl(I) como especie más apropiada para incrementar la emisión fosforescente, se procedió al estudio de la influencia que sobre esta pueda

ejercer la concentración de la disolución de metal. Para ello se realizó una experiencia en la que se midió la señal de fosforescencia emitida por distintas muestras preparadas con diferentes concentraciones de Tl(I) comprendidas entre 0,03 y 0,36 mol.L⁻¹. Tanto las muestras como sus respectivos blancos, fueron preparadas en las condiciones que hemos venido utilizando hasta este momento y las medidas de fosforescencia se realizaron bajo las condiciones instrumentales ya señaladas con anterioridad.

Los datos obtenidos, que están incluidos en la tabla 3.4 y representados en la figura 3.4, son la media de tres medidas independientes para cada uno de los casos, lo que nos permite obtener el valor de la desviación normal relativa que figura en la última columna de la citada tabla.

Figura 3.4. Influencia de la concentración de metal pesado Tl(I).

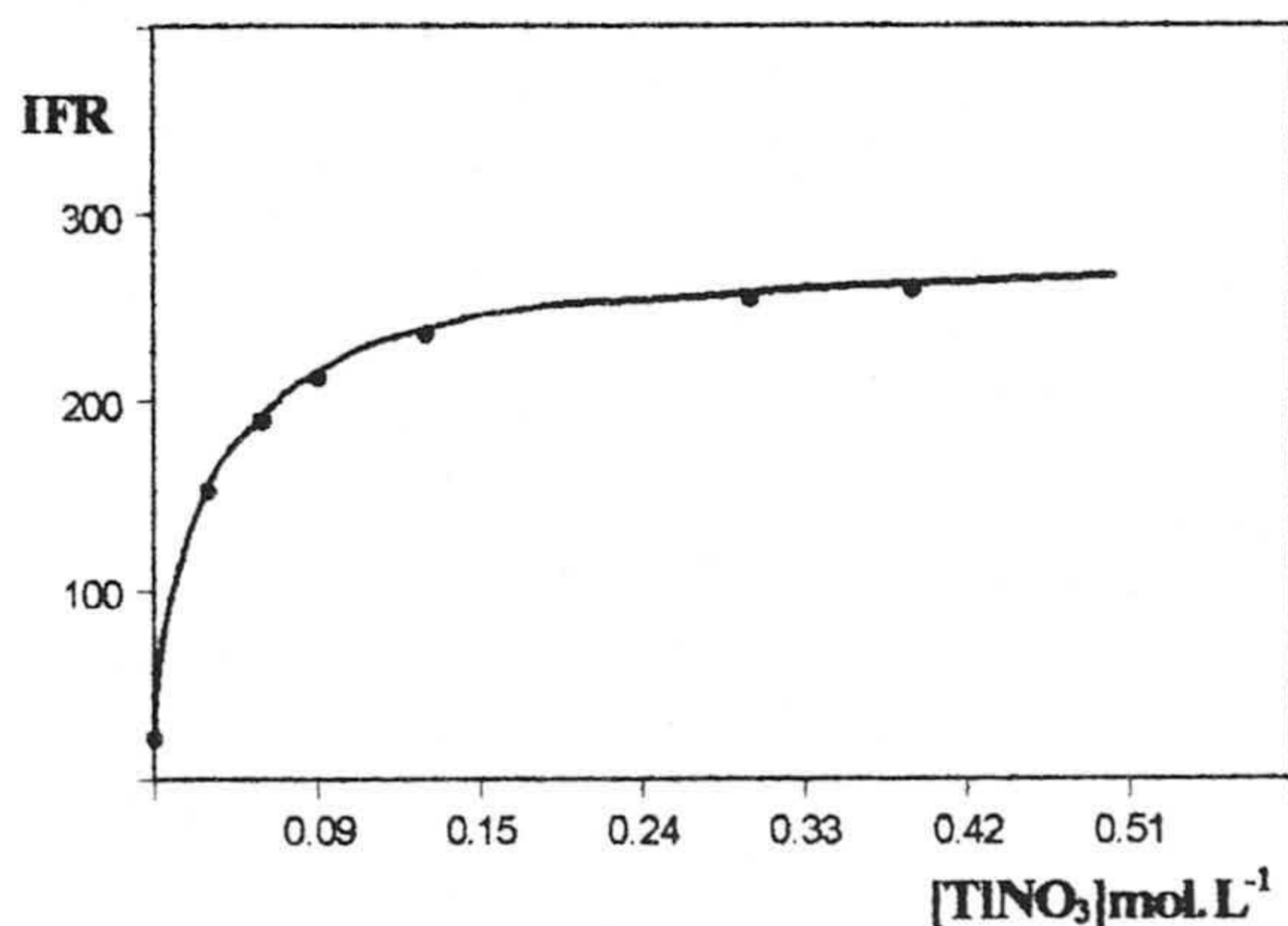


Tabla 3.4.

[Tl]	IFR	DNR%
0,00	22,5	3,4
0,03	153,2	3,0
0,06	170,5	2,5
0,09	200,6	2,6
0,15	225,5	2,1
0,30	255,7	2,0
0,36	260,6	2,2

Como podemos apreciar la intensidad de fosforescencia aumenta al aumentar de la concentración del metal pesado hasta alcanzar un valor máximo para

una concentración 0,36 M de la disolución de $TlNO_3$, valor este que utilizaremos en posteriores experiencias.

3.2.1.4. Influencia del volumen de disolución de metal pesado.

Con objeto de determinar el volumen óptimo de disolución de metal pesado necesario para obtener la máxima intensidad de fosforescencia, se estudió a continuación la posible influencia de esta variable sobre la señal analítica, preparando para ello distintas muestras en las que el volumen de disolución de $TlNO_3$ variaba entre 2 y 20 μL de disolución 0,36 M. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 3.5 y se representan en la figura 3.5

Figura 3.5. Influencia del volumen de disolución de metal pesado sobre la IFR.

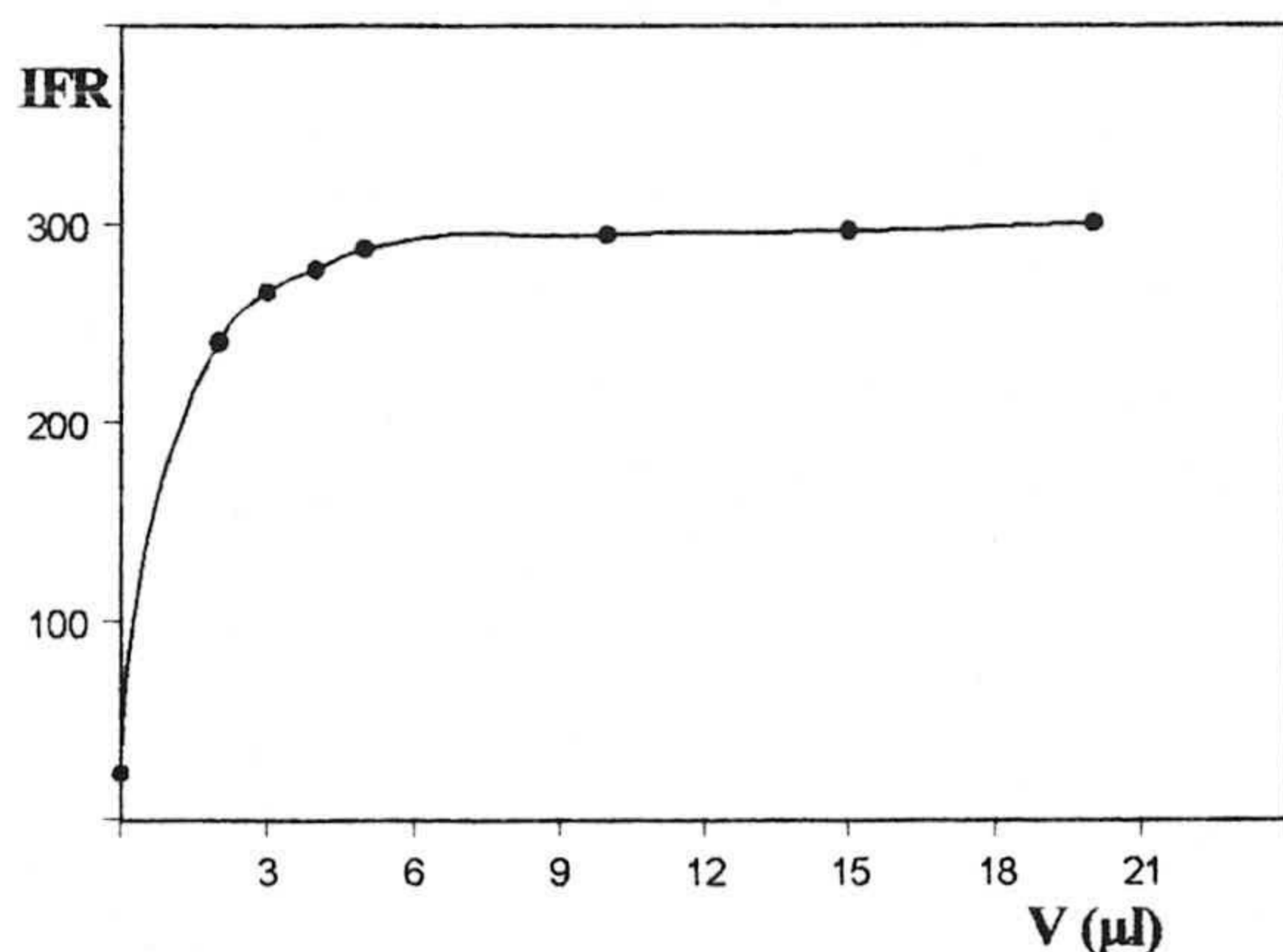


Tabla 3.5.

V(µL)	IFR	DNR %
0	23,6	6,3
2	240,7	2,4
3	266,0	2,1
4	277,3	1,9
5	288,0	1,8
10	292,0	1,3
15	293,0	1,8
20	297,0	2,8

Los resultados obtenidos de esta experiencia indican que la señal de fosforescencia transmitida del CBL crece al aumentar del volumen de la disolución de $Tl(I)$, hasta alcanzar de un máximo a 5 μL , a partir de cuyo valor el aumento experimentado no es significativo. Para posteriores experiencias se ha fijado en 5 μL el valor de esta variable.

3.2.1.5 Influencia del uso de láminas de cuarzo sobre la intensidad de fosforescencia.

Como ya se ha constatado en el capítulo anterior y para disminuir el efecto del oxígeno atmosférico y de la humedad sobre la fosforescencia emitida, se pensó en utilizar dos láminas de cuarzo y colocar la muestra entre ambas en el momento de efectuar la medida de fosforescencia.

Las experiencias se realizaron como en el capítulo anterior comprobando todas las posibilidades de uso o no de las láminas de cuarzo y la utilización de atmósfera de N₂ o sin ella. En todos los casos las muestras fueron preparadas y medidas en la forma descrita con anterioridad. Los resultados obtenidos están incluidos en la tabla 3.5

Tabla 3.5. Influencia del uso de las láminas de cuarzo y la corriente de nitrógeno sobre la IF de CBL.

T(min)	IFR ^{CCN}	IFR ^{CSN}	IFR ^{SCN}	IFR ^{SSN}
0	259,2	254,4	204,7	180,5
2	265,3	255,5	210,6	186,2
4	267,5	260,4	210,6	182,5
6	269,4	262,2	210,4	175,6
8	271,3	262,4	210,6	167,1
10	269,5	262,5	210,6	155,7
12	270,4	262,5	210,6	144,2
14	270,7	260,6	211,2	137,7
16	269,6	258,5	210,6	131,2
18	270,0	256,5	210,5	127,6
20	270,3	253,5	210,6	124,5
22	271,1	249,5	210,6	121,8
24	269,7	243,5	210,6	119,4
26	269,5	238,2	210,6	118,7
28	269,6	232,5	210,6	115,9
30	269,0	229,5	210,6	113,5

*CCN: Con láminas de cuarzo y corriente de nitrógeno.

*CSN: Con láminas de cuarzo y sin corriente de nitrógeno.

*SCN: Sin láminas de cuarzo y con corriente de nitrógeno.

*SSN: Sin láminas de cuarzo y sin corriente de nitrógeno.

Se comprueba, como señala la figura 3.6, que el uso de láminas de cuarzo para proteger el papel con el analito fijado permite realizar la medida sin necesidad de tener que usar nitrógeno en un intervalo de media hora lo que redundará en una simplificación del procedimiento operatorio.

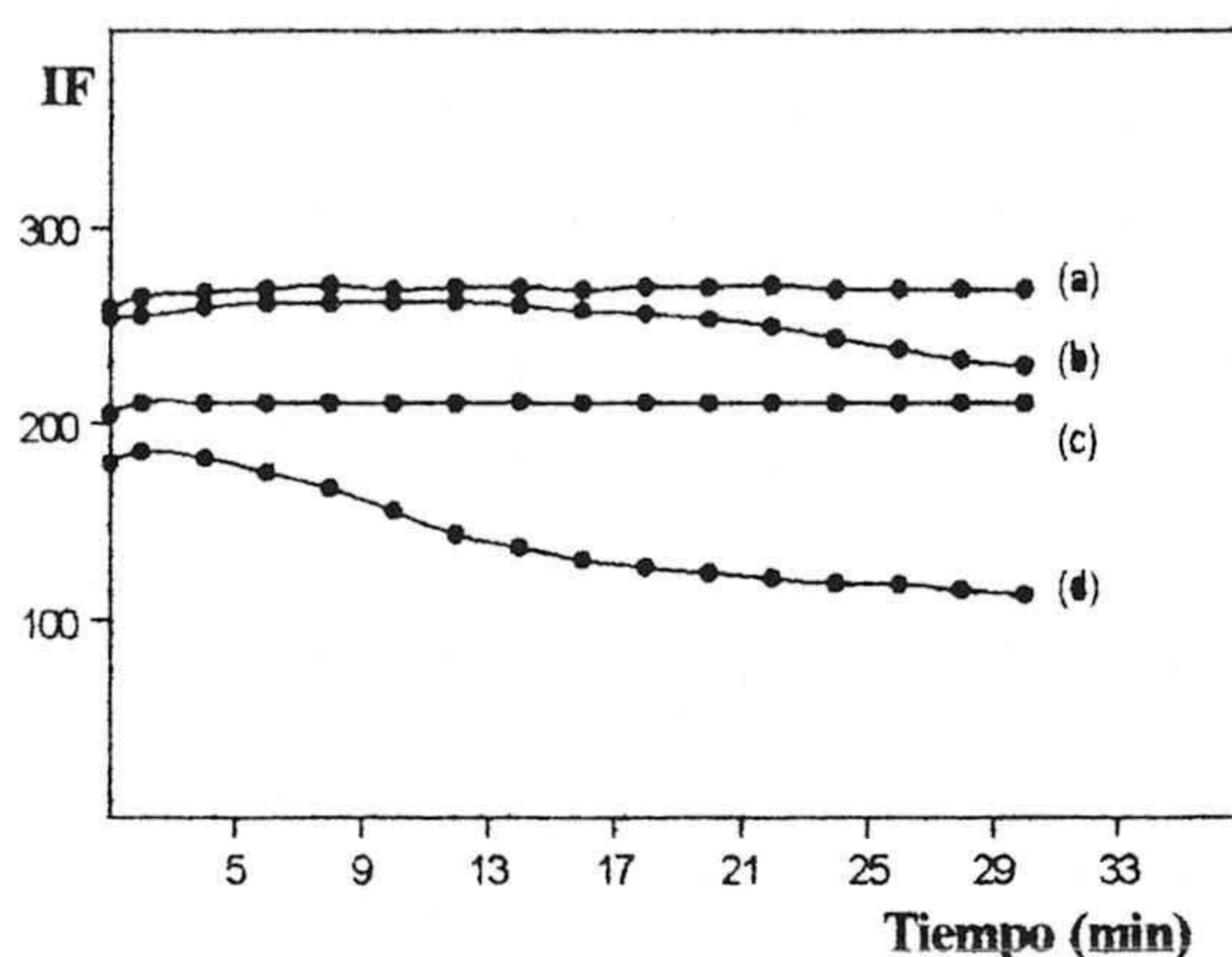


Figura 3.6. Intensidad de fosforescencia.
(a) Con láminas de cuarzo y N₂.
(b) Con láminas de cuarzo sin N₂.
(c) Sin láminas de cuarzo con N₂.
(d) Sin láminas de cuarzo ni N₂.

3.2.1.6. Influencia del pH del medio.

En este apartado vamos a estudiar la influencia del pH de la disolución de CBL sobre la intensidad de fosforescencia. Es sabido que el CBL en medio básico sufre un proceso de hidrólisis dando lugar a 1-naftol. Ese hecho unido a que algunos de los soportes sólidos son cambiadores iónicos, nos hizo pensar en las distintas posibilidades de fijación del mismo sobre diferentes soportes sólidos. No obstante, se comprobó que el papel W4 que venimos utilizando hasta este momento es el que mejor respuesta presenta.

Para llevar a cabo este estudio, se preparó una serie de disoluciones de analito en las que el pH variaba entre 0,8 y 13,1 utilizando para ello disoluciones de HCl y NaOH de diferentes concentraciones y manteniendo las mismas condiciones experimentales anteriormente reseñadas. El soporte sólido empleado fue papel W4

y se obtuvieron los resultados que se resumen en la tabla 3.5, y se representan en la figura 3.7.

Figura 3.7. Influencia del pH sobre la IFR del CBL

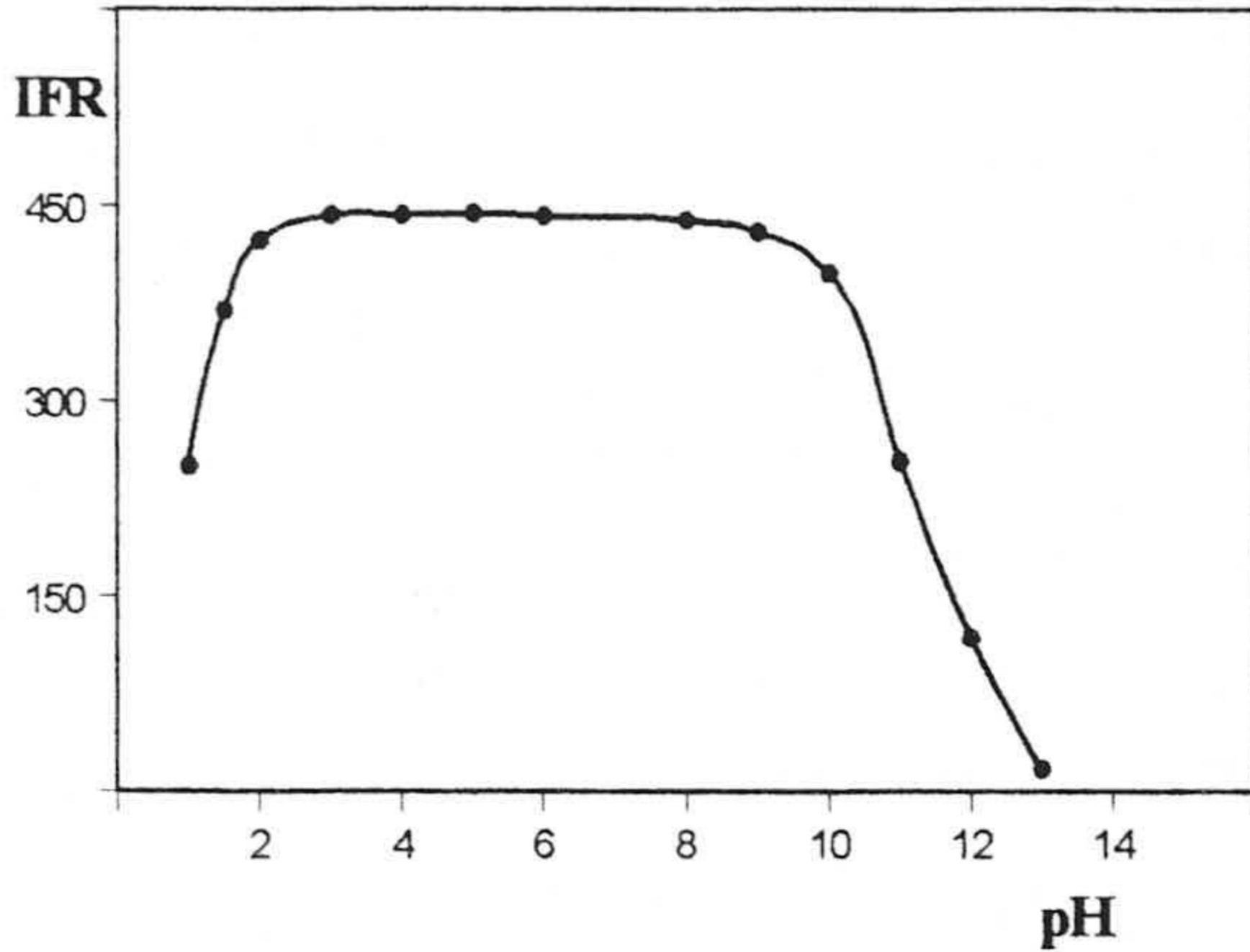


Tabla 3.6.

pH	IFR	pH	IFR
0,8	220	6,1	442
1,0	250	8,0	439
1,5	430	9,1	430
2,0	438	10,1	398
3,0	443	11,1	254
4,0	443	12,1	118
5,0	444	13,1	17

Como se observa en la figura 3.7 la intensidad de fosforescencia del CBL permanece prácticamente constante para valores de pH comprendidas entre 1,5 y 9,0, sufriendo una fuerte disminución para valores de pH inferiores o superiores a los límites señalados. La caída de la intensidad de fosforescencia para valores de pH mayores que 9,0 se deben a la desaparición del CBL como consecuencia del proceso de hidrólisis, mientras que la caída para valores de pH inferior a 1,5 puede ser atribuida a una precipitación del $TlCl_3$, lo que trae como consecuencia que no se exalte la fosforescencia del analito.

En nuestro caso, al no variar la señal de fosforescencia en un amplio rango de pH, podemos trabajar sin necesidad de utilizar disolución reguladora ya que el pH natural de la disolución de CBL se encuentra en la zona central del intervalo en el cual la fosforescencia es máxima.

3.2.1.7. Influencia de la fuerza iónica.

Para saber la influencia que la fuerza iónica puede ejercer sobre la intensidad fosforescente del CBL hemos utilizado cloruro sódico como electrolito, preparándose una serie de disoluciones en las cuales, se pusieron cantidades crecientes de NaCl hasta 1,1 M. Los resultados experimentales obtenidos a partir de tres determinaciones diferentes son los que figuran en la tabla 3.7 y se representan en la figura 3.8.

Figura 3.9. Influencia de la fuerza iónica sobre IFR del CBL.

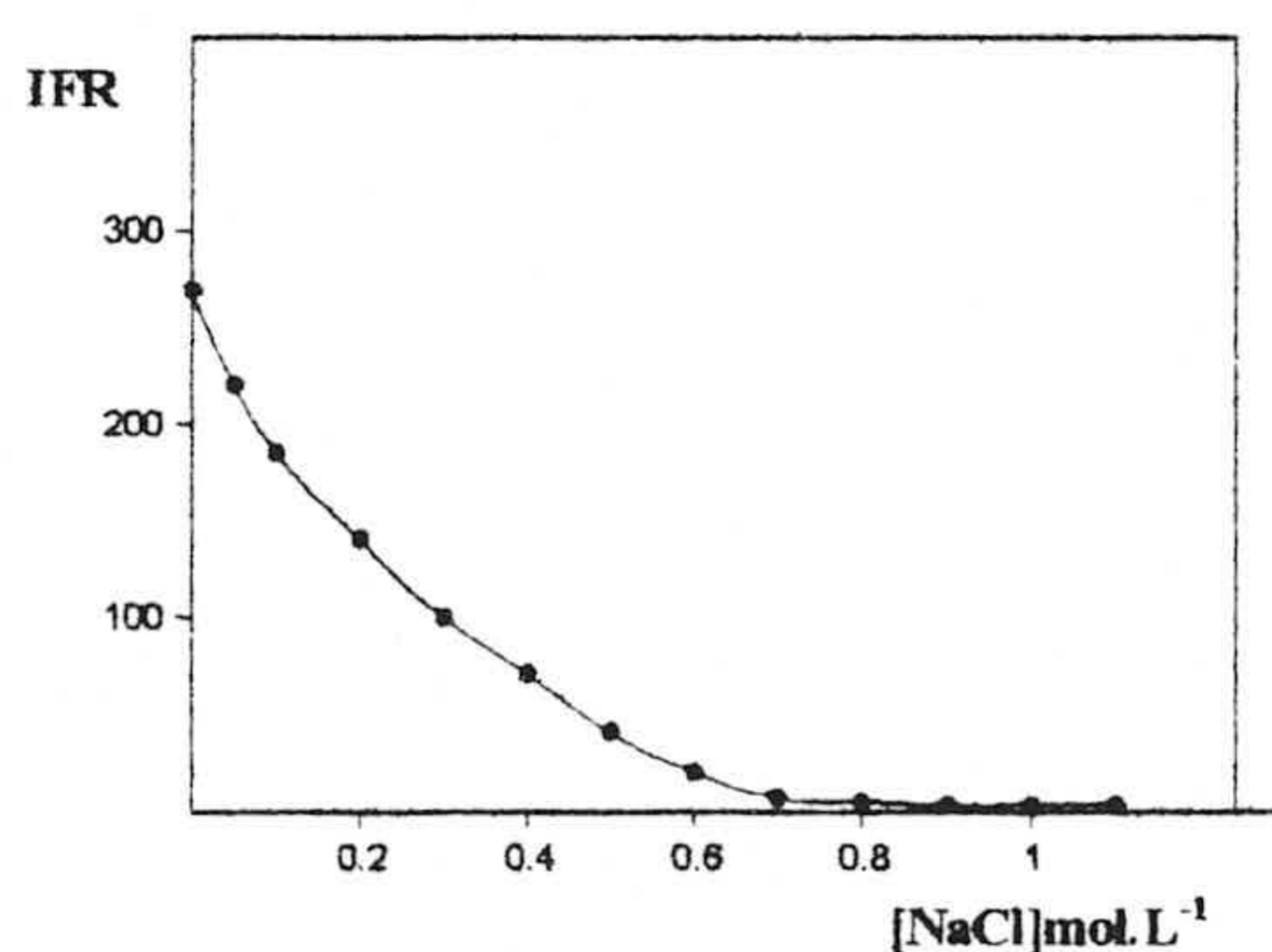


Tabla 3.7.

[NaCl] M	IFR	DNR (%)	[NaCl] M	IFR	DNR (%)
0,00	269,3	1,5	0,60	20,4	3,1
0,05	220,3	2,1	0,70	7,32	4,1
0,10	185,2	2,5	0,80	5,22	4,0
0,20	140,1	2,7	0,90	3,21	3,7
0,30	100,4	3,0	1,00	3,04	3,5
0,40	70,5	3,2	1,10	3,05	4,9
0,50	41,0	2,9			

De la gráfica mostrada en la figura 3.9 se concluye que la presencia de NaCl disminuye marcadamente la intensidad de fosforescencia del CBL observándose una caída del 48,9% para una concentración 0,2 M de NaCl y una desaparición de la señal cuando la concentración alcanza el valor de 0,70 M, lo cual puede estar relacionado no solo con un aumento de fuerza iónica sino también con la precipitación de TlCl.

3.2.1.8. Influencia del volumen de muestra.

Otra de las variables que influyen en la intensidad de fosforescencia es el volumen de muestra depositado sobre el soporte sólido. Para estudiar esta influencia se prepararon diferentes muestras en las que el volumen depositado variaba entre 0,5 y 7,5 μL , manteniendo constantes las restantes variables experimentales. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 3.8. y se representan en la figura 3.9.

Figura 3.9 Influencia del volumen de muestra sobre la IFR del CBL.

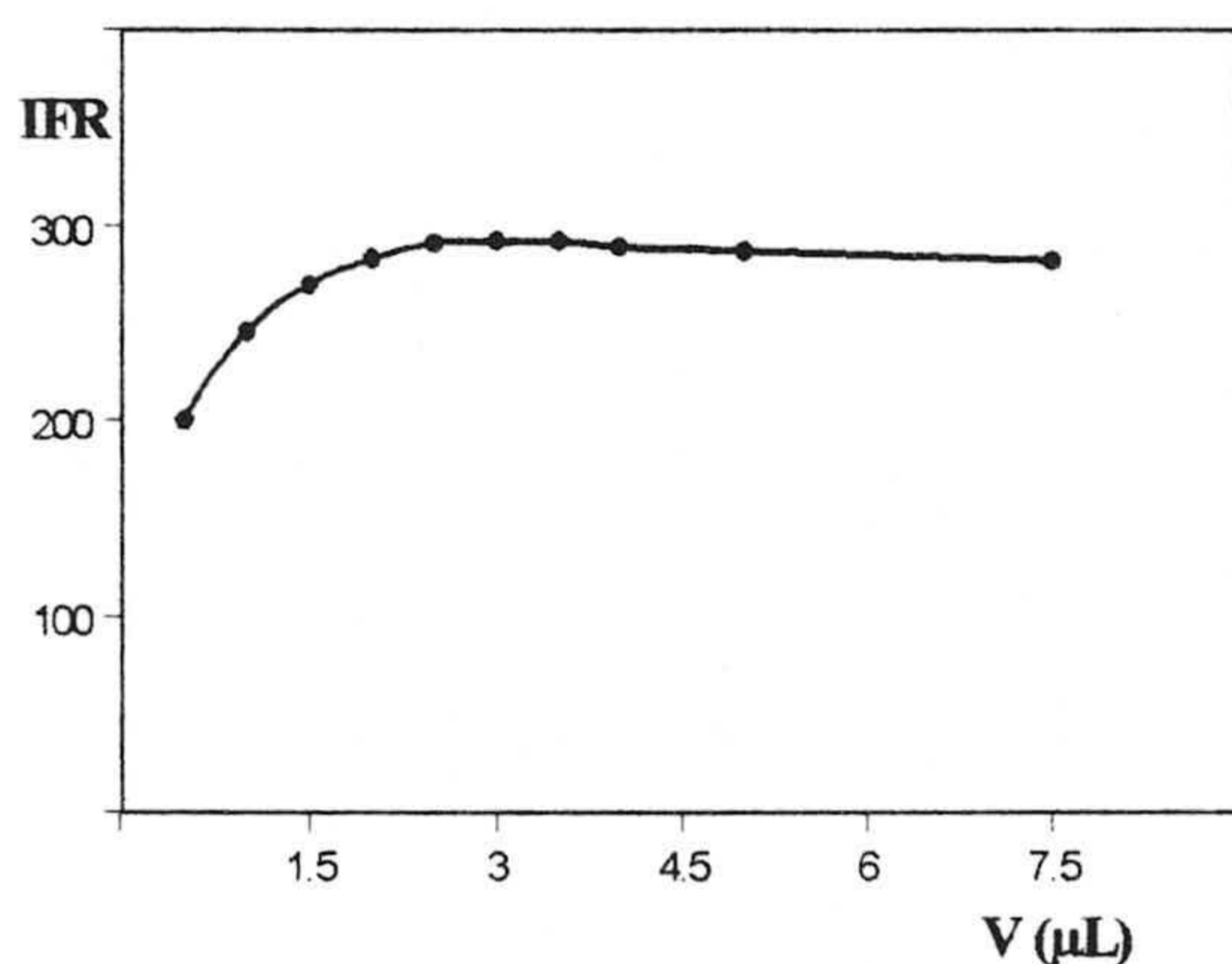


Tabla 3.8.

(V) (μL)	IFR	DNR(%)
0,5	200	3,1
1,0	246	2,0
1,5	270	1,5
2,0	283	2,3
2,5	291	1,6
3,0	292	0,9
3,5	292	2,5
4,0	290	2,9
5,0	288	3,0
7,5	282	3,5

De la anterior figura se puede deducir que 2,5 μL de disolución de CBL son suficientes para cubrir la parte de superficie de la tira de papel irradiada por el haz de excitación y, por tanto, un mayor volumen no produce un incremento apreciable de la señal fosforescente.

3.2.1.9. Influencia del tiempo de secado

Uno de los parámetros experimentales que pueden influir y ejercer un papel importante sobre la intensidad de fosforescencia es el tiempo de secado de la muestra una vez depositada sobre el soporte sólido ya que la presencia de humedad

disminuye sensiblemente la emisión de fosforescencia. Por ello, para comprobar la influencia de este parámetro, se realizó una experiencia en la que se midió la señal de fosforescencia transmitida para distintas muestras secadas bajo una corriente de aire caliente. Para tal fin se usó un secador de pelo doméstico, durante diferentes intervalos de tiempo que abarcan desde 0,5 hasta 6 minutos, con una potencia de 250 vatios, situando el secador a una altura de 10 cm sobre la muestra. Los datos obtenidos en tres determinaciones diferentes para cada caso se resumen en la tabla 3.9 y se representan en la figura 3.10.

Figura 3.10. Influencia del tiempo de secado de la muestra

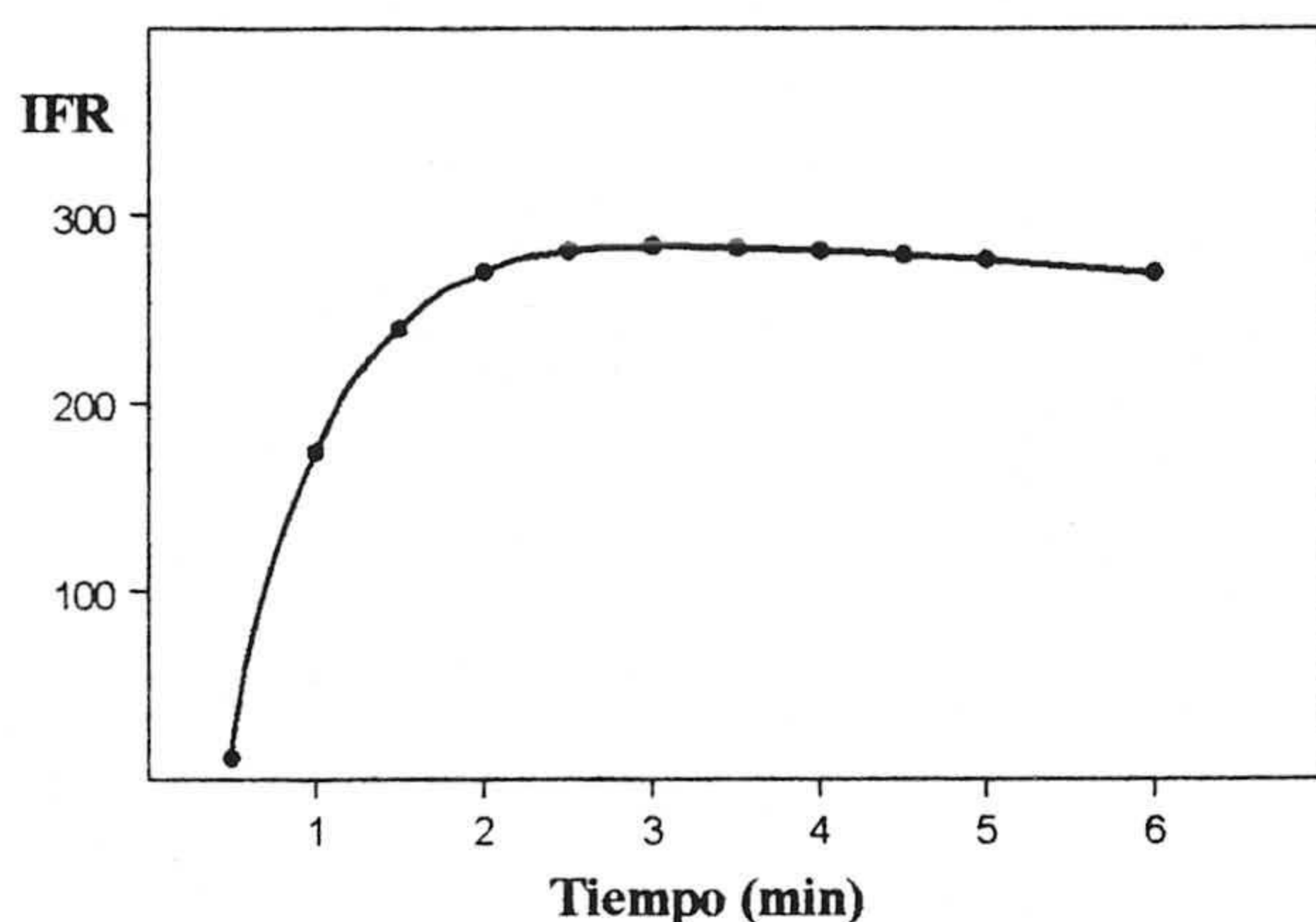


Tabla.3.9

T (min)	IFR	DNR%
0,5	10,5	4,2
1,0	174,2	2,9
1,5	240,0	1,8
2,0	270,1	2,1
3,0	283,5	1,1
3,5	282,0	1,5
4,0	281,0	2,8
4,5	279,0	3,1
5,0	276,3	2,3
5,5	273,5	2,6
6,0	269,4	3,0

Los resultados anteriores nos permiten decir que la señal de fosforescencia aumenta a medida que lo hace tiempo de secado hasta alcanzar un valor máximo a los 3 minutos a partir del cual permanece estable. Para posterior experiencias este fue el tiempo de secado empleado.

3.2.2. Optimización de variables instrumentales.

Las medidas de intensidad de fosforescencia están muy condicionadas por los valores de los parámetros instrumentales: tiempos de retraso (t_d) y de lectura del detector (t_g) y anchura de las rendijas de excitación y emisión. Para conocer su influencia se procedió de la forma que exponemos a continuación.

3.2.2.1. Optimización de las rendijas de excitación y emisión.

Para optimizar los valores correspondientes a la anchura de las rendijas de excitación y emisión se registraron los espectros de emisión de diferentes muestras, preparadas en la forma indicada en experiencias anteriores, efectuando las medidas de intensidad de fosforescencia a $\lambda_{exc} = 282$ nm y $\lambda_{em} = 486$ nm, variando alternativamente las rendijas de emisión y excitación y manteniendo constantes los demás parámetros instrumentales. De los resultados obtenidos se deduce que 2,5 y 5,0 nm, para excitación y emisión respectivamente, son los valores más favorables.

3.2.2.2. Optimización de los tiempos de retraso y lectura del detector.

Para el estudio de estas variables se procedió de forma similar a la del apartado anterior, midiendo la intensidad de fosforescencia para tiempos de retraso (t_d) comprendidos entre 0,1 y 0,3 ms y tiempos de lectura del detector (t_g) comprendidos entre 1 y 12 ms. Los resultados obtenidos en esta experiencia se resumen en la tabla 3.10.

Tabla 3.10 Influencia de t_g y t_d sobre la IFR

t_d (ms)	t_g (ms)	IFR	t_d (ms)	t_g (ms)	IFR	t_d (ms)	t_g (ms)	IFR
0,1	6	283	0,2	6	260	0,3	6	250
0,1	8	333	0,2	8	310	0,3	8	305
0,1	10	392	0,2	10	360	0,3	10	350
0,1	12	432	0,2	12	410	0,3	12	395

De los resultados obtenidos en esta experiencia, se puede deducir que al aumentar el tiempo de lectura del detector, manteniendo constante el tiempo de retraso en la apertura, aumenta la intensidad fosforescente emitida observándose un incremento similar en todos los casos, mientras que al aumentar el tiempo de retraso en la apertura del detector, manteniendo constante el de lectura, la intensidad emitida es prácticamente la misma cualquiera que sea el valor de t_d . En consecuencia hemos elegido los valores de $t_g = 12$ ms y $t_d = 0,10$ ms como valores óptimos ya que con ellos se observa la mayor intensidad de fosforescencia.

3.3. PROCEDIMIENTO OPERATORIO

Una vez optimizadas las variables experimentales que afectan a la intensidad de fosforescencia emitida por el analito, podemos establecer el siguiente procedimiento operatorio para la preparación de la muestra y condiciones de medida: sobre una tira de papel Whatman nº4 de (4,5x1,2cm), se depositan 5 μ L de disolución de TINO₃ 0,36 M y 2,5 μ L de la disolución hidroalcohólica (10% etanol en agua) de muestra o patrón. A continuación se seca la muestra mediante una corriente de aire caliente durante de un periodo de tiempo de dos minutos, se coloca la tira de papel entre las dos láminas de cuarzo y se introduce en el compartimento de muestras del instrumento formando un ángulo de 45° con el haz de excitación. Las medidas de intensidad de fosforescencia transmitida a temperatura ambiente se realizaron a $\lambda_{exc} = 282$ nm, $\lambda_{em} = 486$ nm, $t_g = 12$ ms, $t_d = 0,10$ ms.

3.4. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE CBL.

Con objeto de conocer la zona de linealidad de respuesta y como varía la intensidad de fosforescencia transmitida en función de la concentración de CBL, se

realizó la siguiente experiencia. En matraces aforados de 25 mL de capacidad se introdujeron cantidades crecientes de disolución hidroalcohólica (del 10% de etanol en agua) de CBL de $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de concentración y etanol/agua (10% v/v) hasta el enrase. De cada uno de los matraces se prepararon tres muestras replicadas independientes, y se midieron sus respectivas emisiones fosforescentes. Los datos obtenidos se resumen en la tabla 3.11 y se representan en la figura 3.11.

Figura 3.11 Influencia de concentración del CBL

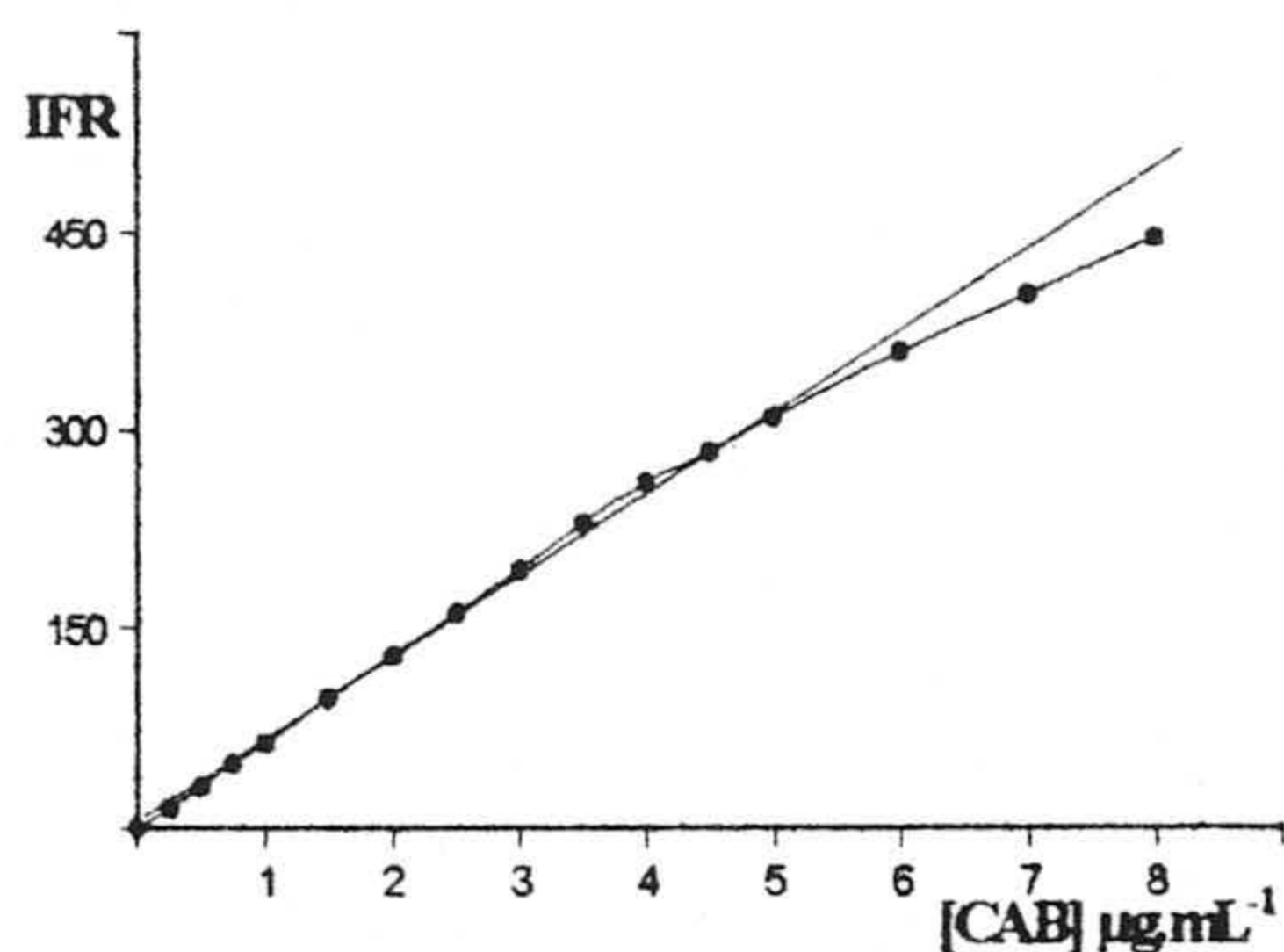


Tabla 3.11

[CBL] $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	IFR	[CBL] $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	IFR
0,00	0,0	3,00	192,0
0,25	15,3	3,50	225,0
0,50	32,0	4,00	261,0
0,75	52,0	4,50	280,0
1,00	64,0	5,00	311,0
1,50	97,0	6,00	360,0
2,00	126,0	7,00	406,0
2,50	159,0	8,00	450,0

De los datos anteriores se deduce que existe una relación lineal entre la intensidad de fosforescencia transmitida a temperatura ambiente y la concentración de CBL hasta un valor máximo de $4,0 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Para valores superiores de concentración la relación no es lineal ya que la desviación de la curva experimental respecto de la linealidad teórica es superior al 5%, valor este que hemos tomado como límite superior del intervalo de linealidad.

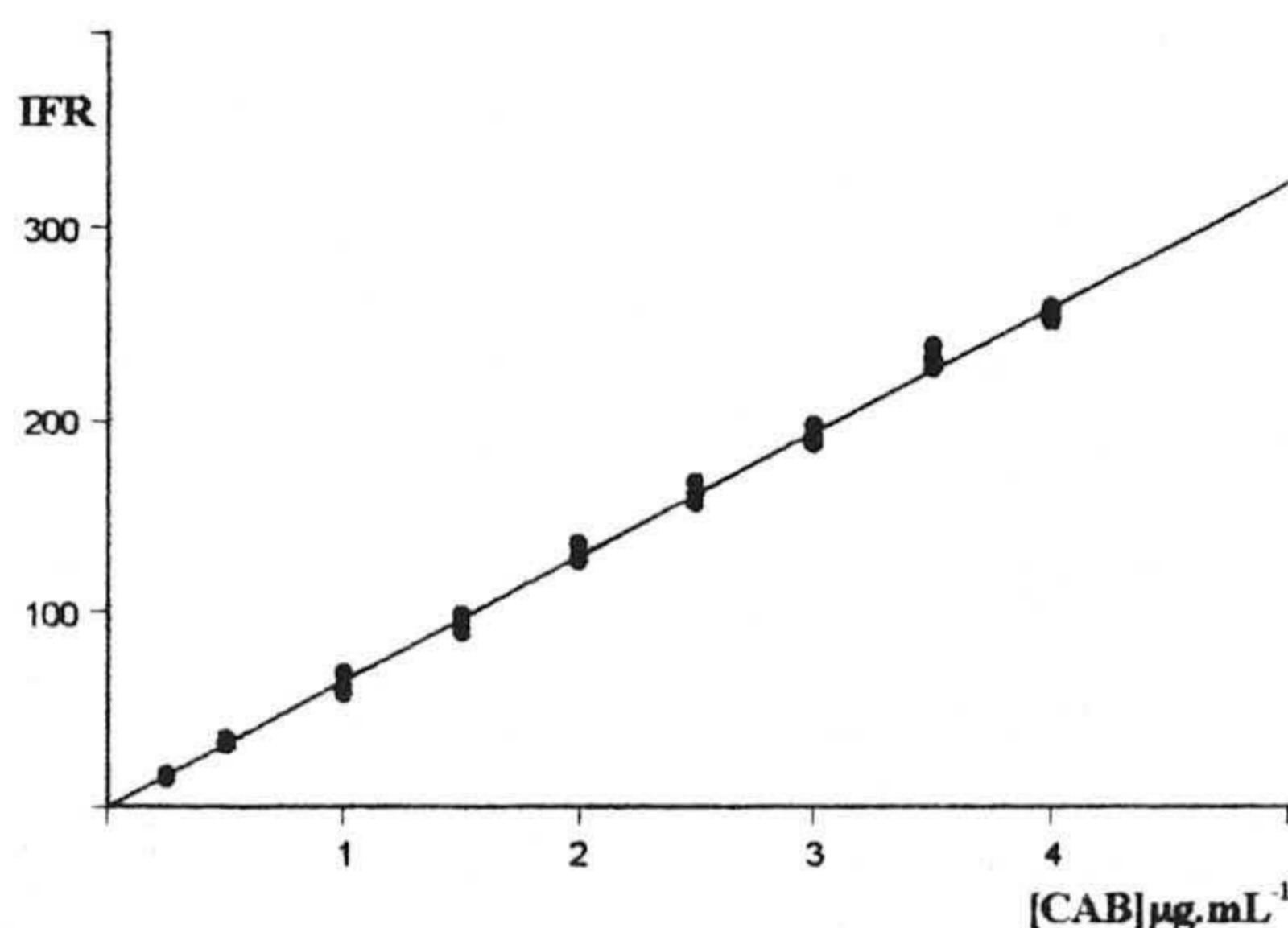
Tabla 3.12. Resumen de los valores óptimos de las variables experimentales

Variables	Valor óptimo	Variables	Valor óptimo
SopORTE sólido	Papel de W nº4	λ_{exc}	282
Metal pesado	Tl(I)	λ_{em}	486, 520
Concentración de Tl(I)	0,36M saturado	Rendija excitación	2,5 nm
pH	de la disolución	Rendija emisión	5 nm
Volumen de muestra	2,5 μ L	t_d	0,1 ms
Volumen de Tl(I)	5 μ L	t_g	12 ms
Tiempo de secado	3 min	Ángulo de incidencia	45°

3.5. PARÁMETROS ANALÍTICOS.

3.5.1. Recta de calibrado

Para establecer la recta de calibrado, se preparó una serie de matraces aforados de 25 mL en los que se introdujeron cantidades crecientes de disolución patrón de CBL de $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de concentración, las cantidades de etanol necesarias en cada caso para mantener la proporción alcohólica (10%) y agua destilada hasta el enrase. A continuación, de cada una de estas disoluciones se prepararon tres muestras replicadas de acuerdo con el procedimiento operatorio y se midieron sus

Figura 3.12. Recta de calibrado**Tabla 3.14.**

[CAB] $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	IRF (tres réplicas)		
0,35	22,1	21,0	23,5
0,50	33,4	31,9	35,0
1,00	58,0	69,0	62,0
1,50	96,0	99,0	90,0
2,00	130,0	127,0	136,0
2,50	162,0	168,0	157,0
3,00	198,0	192,0	188,0
3,50	239,0	232,0	227,0
4,00	255,0	259,0	252,0

intensidades de fosforescencia. Con los resultados experimentales obtenidos se confeccionó la tabla 3.14 y de ellos se obtuvo la recta de calibrado que representamos en la figura 3.12 cuyos parámetros figuran en la tabla 3.15.

Mediante el programa informático Statgraphics se obtuvieron los parámetros estadísticos del calibrado que figuran en la tabla 3.15.

Tabla 3.15 Parámetros estadísticos del calibrado

Parámetros	Valores encontrados
n	27
m	3
a	0,202
b	64,42
S _a	1,332
S _b	0,559
S _{R,C}	3,585
P _{R,C} (lack of fit)	64,42
R ²	99,81

- a: Ordenada en el origen.
- b: Pendiente
- S_a: Desviación estándar de la ordenada en el origen.
- S_b: Desviación estándar de la pendiente.
- R: Coeficiente de correlación.
- R²: Coeficiente de determinación.
- S_{R,C}: Desviación estándar de la regresión.
- P_{R,C}: Nivel de significación del test de fallo de ajuste

El test de fallo ajuste demuestra que hay un buen ajuste del modelo de regresión lineal a los datos experimentales ya que $p > 5\%$ ($p = 41,84\%$) para un nivel de confianza del 95%. La gráfica de los residuales frente a la concentración de CBL, presenta una distribución aleatoria de los residuales, lo que es una prueba más del buen ajuste logrado con los datos de la recta de calibrado. El análisis de la varianza (ANOVA), en el intervalo lineal comprendido entre 0,25 y 4,00 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, pone de manifiesto el buen ajuste lineal del modelo.

Admitiendo que se cumplen las hipótesis matemáticas del modelo de mínimos cuadrados (normalidad, aleatoriedad e independencia) se obtiene la siguiente función de calibrado.

$$\text{IFR} = 64,29[\text{CBL}] + 0,407$$

Donde [CBL] está en $\mu\text{g.mL}^{-1}$

Tabla 3.16 Resultados del ANOVA correspondiente a los datos experimentales

Fuente	S.C	g.l	M.C	F _{exp}	P(%)
Modelo	170688,11	1	170688,11	13280,4	0,0000
Residuales	321,31555	25	12,85262		
Fallo de ajuste	94,705948	7	13,529421		
Error puro	226,60960	18	12,58942	1,07467	41,843

S.C: Suma de cuadrados.

M.C: Media de cuadrados.

3.5.2. Linealidad: $\text{Lin}(\%) = [1 - \text{DNR}(b)] \times 100 = [1 - 0,0085] \times 100 = 99,15 \%$

donde: $\text{DNR}(b) = S_b/b = 0,55/64,41 = 0,0085 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$

3.5.3. Sensibilidad a) Sensibilidad de calibrado: $S_{\text{cal}} = b = 64,41 (\mu\text{g}/\text{mL})^{-1}$.

b) Sensibilidad analítica: $S_{\text{anal}} = S_{R,C}/b = 3,575/64,41 = 0,056 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$.

3.5.4 Límites de detección y cuantificación.

El cálculo de los límites de detección y cuantificación se realizaron siguiendo las normas de IUPAC. Para ello se prepararon 10 disoluciones blanco contiendo todos los reactivos, excepto el analito y siguiendo el procedimiento operatorio propuesto. Se midieron sus intensidades de fosforescencia y se obtuvieron los resultados que se resumen en la tabla 3.18.

Tabla 3.18. Repetibilidad de blanco.

Disolución nº	IFR (blanco)
1	87,9
2	87,0
3	83,0
4	85,0
5	88,0
6	88,0
7	85,0
8	83,0
9	85,0
10	87,0

$\bar{X} = 85,90$ $S_{n-1} = 2,00$ $\text{DNR} = 2,3\%$

\bar{X} = valor medio de la señal de los blancos.

S_{n-1} = desviación estándar de los valores del blanco.

DNR = desviación normal relativa.

Para calcular los valores de los límites de detección y cuantificación, se utilizaron los resultados de la tabla 3.18 y las definiciones de límite de detección y límite de cuantificación admitidas por la IUPAC, obteniéndose los siguientes resultados:

Límite de detección: $LD = 3s_b/b = 0,093 \mu\text{g.mL}^{-1}$

Límite de cuantificación: $LQ = 10s_b/b = 0,31 \mu\text{g.mL}^{-1}$

3.5.5. Rango dinámico lineal

El intervalo de aplicación del método estará comprendido entre el límite inferior, que es el límite de cuantificación, y el límite superior calculado anteriormente mediante el test de fallo de ajuste. Por tanto:

$$RDL = 0,1 (\text{Lim}_{\text{sup}}/\text{Lim}_{\text{inf}}) = 1,29$$

3.5.6. Precisión

La precisión se determinó de las dos formas descritas en el capítulo 1, obteniéndose los siguientes resultados:

a) Repetibilidad del método propuesto aplicado a una muestra patrón.

Se preparan 10 disolución de CBL de $2,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de concentración y, siguiendo la metodología de trabajo establecida, se obtuvieron los resultados resumidos en la tabla 3.19 expresada como desviación estándar relativa.

Tabla 3.19. Repetibilidad del método

Disolución nº	IFR (Muestra)	Disolución nº	IFR (Muestra)
1	268,1	6	260,4
2	259,7	7	257,6
3	262,5	8	254,8
4	255,9	9	252,7
5	259,0	10	254,8

\bar{x}	= 258,55
S_{n-1}	= 4,50
DNR(%)	= 1,7

b) Repetibilidad del método a partir de los datos del calibrado.

En la tabla 3.20 se indican los valores de la precisión obtenidos en función de la concentración valores que se representan en la figura 3.13.

Figura 3.13. Repetibilidad en función de la concentración de CBL

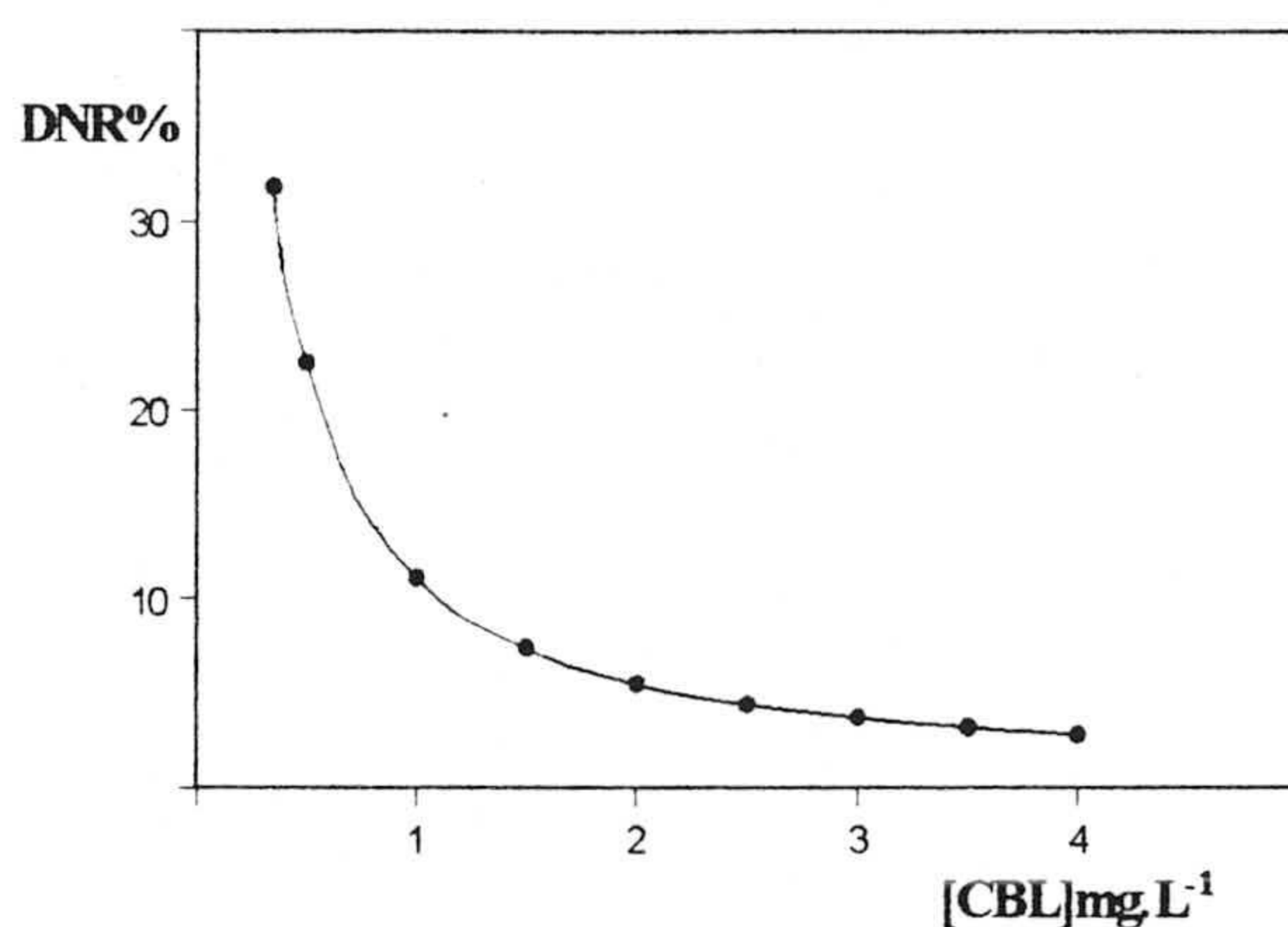


Tabla 3.20.

[CBL] μg.mL ⁻¹	S _c	DNR (%)
0,35	0,1113	31,8
0,50	0,1125	22,5
1,00	0,1108	11,1
1,50	0,1106	7,42
2,00	0,1104	5,52
2,50	0,1105	4,41
3,00	0,1107	3,74
3,50	0,1113	3,24
4,00	0,1080	2,83

Tabla 3.21 Resumen de los parámetros analíticos

Parámetros	Valor
RDL (μg.mL ⁻¹)	1,29
Linealidad (%)	99,15
S _{cal} (μg/mL) ⁻¹	64,41
S _{anal} (μg.mL ⁻¹)	0,056
LD μg.mL ⁻¹	0,093
LQ μg/mL ⁻¹	0,31
r ²	99,81
Fallo de ajuste (%)	41,843

3.6. ESTUDIO DE LAS INTERFERENCIAS.

A continuación se llevó a cabo el estudio de las interferencias que pueden causar en la determinación de CBL la presencia de otros pesticidas (fosforescentes o no) o especies iónicas frecuentes en aguas.

Para ello se preparó una serie de matraces aforados de 25 mL, conteniendo en todos los casos $2,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de CBL y concentraciones crecientes de cada especie ensayada. Efectuadas las medidas de fosforescencia y utilizando la recta de calibrado, se determinó en cada caso el error relativo que origina la presencia de la especie interferente.

Hemos admitido como límite de tolerancia para la especie interferente, la concentración de esta que origina un error relativo superior al 5 %. Los resultados obtenidos están resumidos en la tabla 3.22

Tabla 3.22. Niveles de tolerancia a las sustancias extrañas.

Iones y especies extrañas	Tolerancia ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
Diclone, Captan, Lindano	
Folpet, Paraquat, Dicuat, Ácido húmico, Morestan.y Benomilo.	> 25
Tiabendazol	1
1-Naftol	10
Warfarina	2
Li^+ , Na^+ , K^+ y NH_4^+	> 100
F^- , Cl^- , Br^- y I^-	> 100
SO_4^{-2} , PO_3^{-3} y NO_3^-	> 25
Cu^{+2} , Mg^{+2} Mn^{+2} , y Ca^{+2}	> 25
Al^{+3}	> 25
Fe^{+3}	15

En general se observa una buena selectividad exceptuando la de warfarina y tiabendazol.

3.7. APLICACIONES ANALÍTICAS

Para la aplicación del método propuesto al análisis de muestras reales en las que puede haber trazas de CBL se eligieron aguas de diversas procedencia y productos agrícolas para los que es frecuente el uso de CBL durante su cultivo. Estos fueron: aguas naturales (río Genil, mar Mediterráneo y aguas minerales), aguas

tratadas (agua potable de Granada) y los siguientes productos agrícolas: arroz, trigo y patata.

3.7.1. Determinación de CBL en aguas.

Aplicando la metodología propuesta, en ninguna de estas aguas se detectó la presencia de CBL o la cantidad presente era inferior al límite detectable por el método propuesto. Por ello se efectuó un estudio de recuperación utilizando la recta de calibrado y un método de cromatografía líquida de alta resolución usado como método de referencia para contrastar los resultados obtenidos.

En el caso de agua de mar hubo que someter la muestra a un tratamiento previo con objeto de eliminar su alta salinidad.

3.7.1.1 Aguas minerales, agua del río Genil y agua potable.

Para llevar a cabo este estudio, se realizó la siguiente experiencia: en tres matraces de 25 mL, se prepararon tres disoluciones de CBL, de concentraciones: 1,0, 2,0 y 3,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, enrasando hasta el volumen total con el agua problema correspondiente y manteniendo una proporción de etanol del 10% en todos los casos. A continuación se prepararon las correspondientes muestras, según el procedimiento descrito anteriormente y se efectuaron las medidas de fosforescencia en las condiciones habituales. En todos los casos se obtuvieron y midieron tres réplicas para cada tipo de muestra.

Los valores de intensidad de fosforescencia transmitida a temperatura ambiente medidos se trasladaron a la recta de calibrado y se evaluó la concentración de analito recuperado de la correspondiente muestra. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 3.23.

Tabla 3.23. Recuperación de CBL en aguas.

Agua	[CBL] _p	[CBL] _{m_e}	(S _{n-1})	R(m)%	DNR%
Lanjarón	1,0	0,997	(0,023)	99,70	2,4
	2,0	2,016	(0,082)	100,8	3,5
	3,0	2,952	(0,130)	98,84	4,3
Font Vella	1,0	1,003	(0,041)	100,2	4,1
	2,0	1,977	(0,045)	98,85	2,3
	3,0	3,009	(0,094)	100,3	3,1
Fontdor	1,0	0,983	(0,034)	98,30	3,5
	2,0	1,991	(0,066)	98,77	2,4
	3,0	3,037	(0,084)	101,2	2,8
Río Genil	1,0	0,996	(0,023)	99,60	2,3
	2,0	1,995	(0,053)	99,75	2,7
	3,0	3,011	(0,036)	100,4	1,1
Potable	1,0	0,999	(0,047)	99,90	4,7
	2,0	1,987	(0,038)	99,35	1,9
	3,0	2,975	(0,071)	99,17	3,9

[CBL]_p: Puesto en $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
[CBL]_e: Encontrado en $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

R: Recuperación
DNR%: Desviación normal relativa

3.7.1.2. Aplicación a agua de mar.

En el caso del agua de mar, a causa de la alta concentración de cloruro sódico que contiene, hubo que proceder a eliminar previamente esta salinidad aplicando el siguiente tratamiento previo de la muestra:

Tratamiento del agua de mar: Para evitar la acción de los cloruros del agua de mar, que precipitan el Tl(I) en forma de TlCl evitando así la aparición de fosforescencia, se procedió a su eliminación mediante la adición previa de disolución saturada de TlNO_3 filtrando a continuación, a través de una membrana Millipore de $0,45\ \mu\text{m}$, para eliminar el precipitado formado. En el filtrado se comprobó la existencia de CBL utilizando la recta de calibrado con patrones y se observó que el método no detecta la presencia de CBL.

Estudio de recuperación en agua de mar.

Con objeto de comprobar la validez del método propuesto, se procedió a un estudio de recuperación mediante la recta de calibrado con patrones. Tras apli-

car el tratamiento descrito en el apartado anterior para separar cloruros, se prepararon tres réplicas de muestras que contenían concentraciones de CBL de 1,0, 2,0 y 3,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y se midió su fosforescencia obteniéndose los porcentajes de recuperación que figuran en la tabla 3.26 que son el resultado de las tres réplicas preparadas para cada una de las muestras.

Tabla 3.26. Recuperación de CBL en agua de mar.

$[\text{CBL}]_p$	$[\text{CBL}]_e$ (m)	%R(m)	%DNR
1,00	0,967	96,7	1,2
2,00	1.91	95,5	3,2
3,00	2,94	98,0	3,0

3.7.2. Determinación de CBL en productos agrícolas.

El método propuesto ha sido igualmente aplicado a la determinación de CBL en tres productos agrícolas: patatas, arroz y trigo.

3.7.2.1 Determinación de CBL en patatas.

El procedimiento operatorio se llevó a cabo con una serie de muestras de patata de diferente tamaño, mezcladas con diferentes cantidades de CBL.

Para ello, se tomaron 100 g de patata picada (con cáscara) y a continuación se tomaron muestras de tres tamaños distintos: 5, 10 y 20 g. Dichas muestras se introdujeron en vasos de precipitado, y se le añadieron cantidades de CBL a dos niveles de concentraciones distintos: 1,0 y 2,0 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Las muestras se introdujeron en un baño de ultrasonidos durante tres minutos hasta que quedaron homogeneizadas y, a continuación, en cada vaso se pusieron 40 mL de etanol absoluto, se agitó durante 2 minutos a 700 r.p.m y se filtró a vacío a través de una membrana Millipore N° 3 de 0,45 μm . La pulpa resultante se paso de nuevo al mismo vaso de precipitado y se pusieron otros 40 mL de etanol repitiéndose el proceso. A continuación se añadieron 25 mL de etanol absoluto sobre la pulpa, se filtró de nuevo y todo el filtrado se transfirió a matraz esférico de 250 mL donde se concentró hasta

un volumen de unos 2 mL mediante rotavapor. Este volumen se transfirió a un matraz aforado de 50 mL y se enrasó con una mezcla agua/etanol (9/1 v/v). Con esta disolución se prepararon las muestras analíticas obteniéndose los resultados que se incluyen en la tabla 3.36.

Tabla 3.36 Estudio de la recuperación de CBL en muestras de patata.

Patata				
Tamaño de muestra (g)	C añadida mg.Kg⁻¹	C encontrada mg.Kg⁻¹	R(%)	M(S_{n-1})
5	1	1,023	102,3	99,70(2,39)
	1	0,992	99,20	
	1	0,976	97,6	
	2	2,056	102,8	
	2	2,000	100,0	
	2	1,960	98,00	
10	1	0,985	98,50	99,37(4,06)
	1	0,949	94,90	
	1	1,047	104,7	
	2	1,886	94,30	
	2	1,946	97,30	
	2	1,912	95,60	
20	1	1,010	101,0	97,87(3,05)
	1	0,949	94,90	
	1	0,977	97,70	
	2	1,868	95,40	
	2	2,020	101,0	
	2	1,920	96,00	

Aplicación del criterio de validación de Doerffel a las muestras de patata.

Aplicando el criterio de validación de Doerffel [1,2] obtenemos los resultados que figuran en la tabla 3.37 en donde podemos apreciar que obtenemos recuperaciones medias en todos los casos que no son significativamente distintas del 100% ya que el valor de t calculado es inferior al t tabulado para un nivel de confianza de 95%. Por lo tanto el método es aplicable a la determinación de CBL en patatas con un límite de detección de $LD = 0,093 \text{ mg.Kg}^{-1}$ y límite de determinación de $LQ =$

0,31 mg.Kg⁻¹. Para posteriores experiencias se ha fijado el tamaño de muestra en 10 g para todos los productos agrícolas utilizados en las aplicaciones.

Tabla 3.37. Comprobación de la validez del método en muestras de patata

Tamaño de muestra (g)	Parámetros	Valores calculados
5	\bar{R}	99,98 %
	S_R	2,17
	t_{cal}	0,022
		($t_{tab} = 2,571$)
	P	98,33
10	\bar{R}	97,55 %
	S_R	3,833
	t_{cal}	1,57($t_{tab} = 2,571$)
		17,72
	P	
20	\bar{R}	97,33 %
	S_R	3,20
	t_{cal}	2,04($t_{tab} = 2,571$)
		9,69
	P	

3.7.2.2 Determinación de CBL en arroz y trigo.

El procedimiento utilizado en estos casos muy parecido a lo que aplicamos en el caso anterior, modificado para este tipo de matriz, fijando el tamaño de matriz en 10 g de arroz y trigo.

Para llevar a cabo esta experiencia, partió de dos muestras de 100 g de arroz y de trigo respectivamente, a continuación se tomaron de ellas tres muestras del mismo tamaño 10 g. Dichas muestras se introdujeron en una serie de vasos de precipitado, a estas muestra le añadieron concentraciones crecientes una disolución madre de carbaril 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, se sometieron a ultrasonido durante tres minutos de tal manera que se homogeneizara bien la muestra, y por último, se dejaron estar las

muestras 24hr hasta que quedaron secas tras retirar el liquido. A continuación cada muestra se trató con la misma manera utilizada anteriormente en la patata. Los resultados obtenidas se recogen en la tabla 3.39.

Tabla 3.39. Estudio la recuperación de CBL en muestras de trigo y arroz.

Trigo			
Concentración añadida mg.Kg⁻¹	Concentración encontrada mg.Kg⁻¹	R (%)	(S_{n-1})
1	0,977	97,7	(0,042)
2	1,944	97,2	(0,052)
4	3,929	98,2	(0,133)
Arroz			
1	0,983	98,3	(0,052)
2	1,948	97,4	(0,054)
4	3,840	96,0	(0,106)

Los valores entre paréntesis son la desviación normal correspondiente a tres replicas de la muestra.

3.8. VALIDACIÓN DEL MÉTODO PROPUESTO MEDIANTE CROMATOLOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN.

Con objeto de comprobar la exactitud y validez de los resultados obtenidos mediante nuestro método, se compararon estos resultados con los obtenidos mediante cromatografía líquida de alta resolución, (CLAR) según método establecido por Dilna, Hall, Shamis, y Whitlock [3] que se utilizó como método de referencia.

Comparación de los resultados.

Una vez obtenidos los resultados mediante nuestro método y mediante el de referencia (CLAR) procedimos a la comparación de ambos aplicando el método estadístico descrito en el capítulo 1 de la presente Memoria. Los resultados obtenidos se reflejan en la tabla 3.40.

Tabla 3.40.

AGUAS DE LANJARÓN.			AGUA DE FONT VELLA.		
Parámetros	CLAR	EFS	Parámetros	CLAR	EFS
n	3	3	n	3	3
\bar{c} mg/l	1,010	0,983	\bar{c} mg/l	1,023	1,003
S_{n-1}	0,031	0,034	S_{n-1}	0,041	0,042
t	1,38 (P = 23,97)		t	0,825(P = 45,57)	

AGUA DE FONTDOR.			AGUA POTABLE DE GRANADA.		
Parámetros	CLAR	EFS	Parámetros	CLAR	EFS
n	3	3	n	3	3
\bar{c} mg/l	1,017	0,977	\bar{c} mg/l	1,030	0,999
S_{n-1}	0,33	0,045	S_{n-1}	0,04	0,047
t	1,54(P = 19,84)		t	1,14(P = 31,8)	

AGUA DE RÍO GENIL (GRANADA)			MUESTRA DE ARROZ		
Parámetros	CLAR	EFS	Parámetros	CLAR	EFS
n	3	3	n	3	3
\bar{c} mg/l	1,04	1,023	\bar{c} mg/l	1,001	0,983
S_{n-1}	0,03	0,0229	S_{n-1}	0,038	0,052
t	1,29(P = 26,6)		t	0,600(P = 58,08)	

MUESTRA DE TRIGO			MUESTRA DE PATATA		
Parámetros	CLAR	EFS	Parámetros	CLAR	EFS
n	3	3	n	3	3
\bar{c} mg/l	0,991	0,977	\bar{c} mg/l	1,004	0,994
S_{n-1}	0,036	0,042	S_{n-1}	0,043	0,050
t	0,578(P = 59,42)		t	0,347(P = 74,6)	

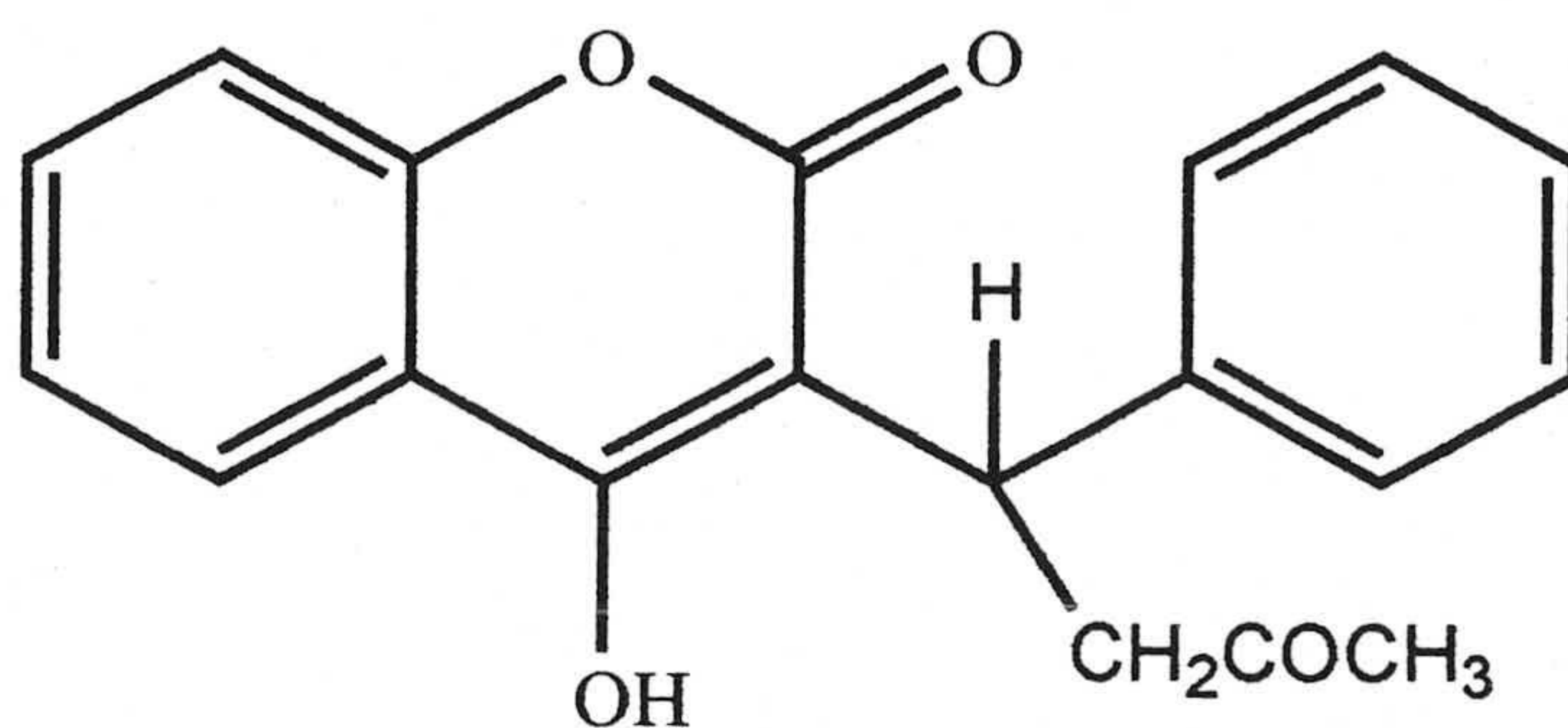
Observemos que en todos los casos se encontraron resultados estadísticamente comparables entre el método propuesto y el de referencia usado.

Como conclusión podemos decir que el método propuesto para la determinación de carbaril ofrece, usando una metodología sencilla, resultados aceptables para la determinación de este plaguicida en muestras de aguas y alimentos.

Como resultado de los estudios realizados se ha publicado un artículo denominado: Determinación of Carbaril in Foodstuffs by Solid-Phase Room - Temperature Phosphorimetry (L. F. Capitán-Vallvey, Mahmoud. K. A. Deheid, and R. Avidad, en la revista *Fresenius. Journal of Analytical Chemistry*, 362, 307-312 (1998), del que hemos incluido una copia en el apéndice nº 2 que figura en esta Memoria.

Bibliografía

1. K. Doerffel, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 183, 348 (1994).
2. K. Doerffel, Analytical Methods Committee, *Analyst*, 29, 120 (1995).
3. V. Dilna, H. Rex, S. Jeff y S. A. Whitlock, *J. Chromatogr.*, 283, 383 (1984).



CAPÍTULO 4

ESTUDIO DE LA WARFARINA MEDIANTE ESPECTROFOSFORIMETRÍA EN FASE SÓLIDA

ÍNDICE DEL CAPÍTULO

4.1	CARACTERÍSTICAS FOSFORESCENTES DEL WARFARINA	225
4.1.1	Espectros bidimensionales del WAR en fase sólida	225
4.2	OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES EXPERIMENTALES	226
4.2.1	Optimización de variables experimentales de la muestra	227
4.2.1.1	<i>Elección del soporte sólido</i>	227
4.2.1.2	<i>Selección del átomo pesado</i>	228
4.2.1.3	<i>Influencia de la concentración de átomo pesado</i>	229
4.2.1.4	<i>Influencia del volumen de disolución del átomo pesado</i>	230
4.2.1.5	<i>Influencia del uso de láminas de cuarzo sobre la intensidad de fosforescencia.</i>	231
4.2.1.6	<i>Influencia del pH del medio</i>	232
4.2.1.7	<i>Influencia de la concentración de NaOH</i>	233
4.2.1.8	<i>Influencia del orden de adición de los reactivos</i>	234
4.2.1.9	<i>Influencia de la fuerza iónica del medio</i>	235
4.2.1.10	<i>Influencia del volumen de muestra depositado en el papel</i>	235
4.2.1.11	<i>Influencia del tiempo de secado</i>	236
4.2.2	Optimización de variables instrumentales	237
4.2.2.1	<i>Optimización del ancho de rendijas</i>	237
4.2.2.2	<i>Optimización de los tiempos del detector</i>	238
4.3	PROCEDIMIENTO OPERATORIO	239
4.4	ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE CONCENTRACIÓN Y SEÑAL ANALÍTICA	239
4.5	PARÁMETROS ANALÍTICOS	241
4.5.1	Recta de calibrado	241
4.5.2	Linealidad	243
4.5.3	Sensibilidad	243
4.5.4	Límites de detección y cuantificación	243
4.5.5	Rango dinámico lineal	244
4.5.6	Precisión	244
4.6	ESTUDIO DE INTERFERENCIAS	245
4.7	APLICACIONES ANALÍTICAS	247
4.7.1	Determinación de WAR en aguas	247
4.7.1.1	<i>Aguas minerales, de río y potable</i>	247
4.7.1.2	<i>Agua de mar</i>	248
4.7.2	Determinación de WAR en suero sanguíneo.	249
4.8	VALIDACIÓN DEL MÉTODO	258
	BIBLIOGRAFÍA	261

El 4-hidroxi-3-(3-oxo-1-fenilbutil)-2H-1-benzopiran-2-ona, comúnmente llamado warfarina (WAR), es un rodenticida empleado en el control de la población de roedores, principalmente ratas. El producto comercial denominado warfarina (mezcla racémica de los isómeros R y S) es soluble en disoluciones acuosas alcalinas y es utilizado con frecuencia durante el periodo de almacenamiento de productos agrícolas, en el control de plagas de roedores tanto en campos de cultivo como en las ciudades. También es usado en medicina por su acción anticoagulante, ya que impide la formación de protrombina, aunque paralelamente incrementa la fragilidad capilar y provoca hemorragias. De ahí la necesidad de disponer de métodos de determinación de este pesticida en diferentes matrices tales como suero sanguíneo o aguas naturales en las que pueda encontrarse esporádicamente como consecuencia de tratamientos médicos o de manipulaciones agrícolas.

4.1. CARACTERÍSTICAS FOSFORESCENTES DE LA WARFARINA.

4.1.1. Espectros bidimensionales en soporte sólido

Para conocer los máximos de excitación y emisión se procedió a registrar los espectros bidimensionales de excitación y emisión de la WAR en fase sólida dado que con ellos se facilita la optimización de las diferentes variables experimentales que afectan a la emisión fosforescente. Para ello, se preparó la muestra como sigue: sobre una tira de papel cromatográfico Whatman W4 se depositaron 10 μL de disolución 0,5 M de NaOH, 5 μL de disolución de disolución 2M de KI y 2,5 μL de la disolución de WAR de 2,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. A continuación se secó la muestra mediante aire caliente hasta que quedó totalmente seca y se colocó entre dos láminas de cuarzo de 4,5x1x0,1 cm registrándose los espectros de fosforescencia emitida bajo las siguientes condiciones instrumentales: para el espectro de excita-

ción la longitud de onda de emisión fue 468 nm, registrándose el espectro entre 275 nm y 400 nm de excitación y para el espectro de emisión la longitud de onda de excitación fue 315 nm registrándose el espectro entre 400 y 600 nm. En ambos casos $t_d = 0,1$ ms, $t_g = 12$ ms, rendijas de excitación y de emisión 2,5 y 10 nm respectivamente y velocidad de barrido = 240 nm.min⁻¹. Los espectros obtenidos los podemos observar en la figura 4.1.

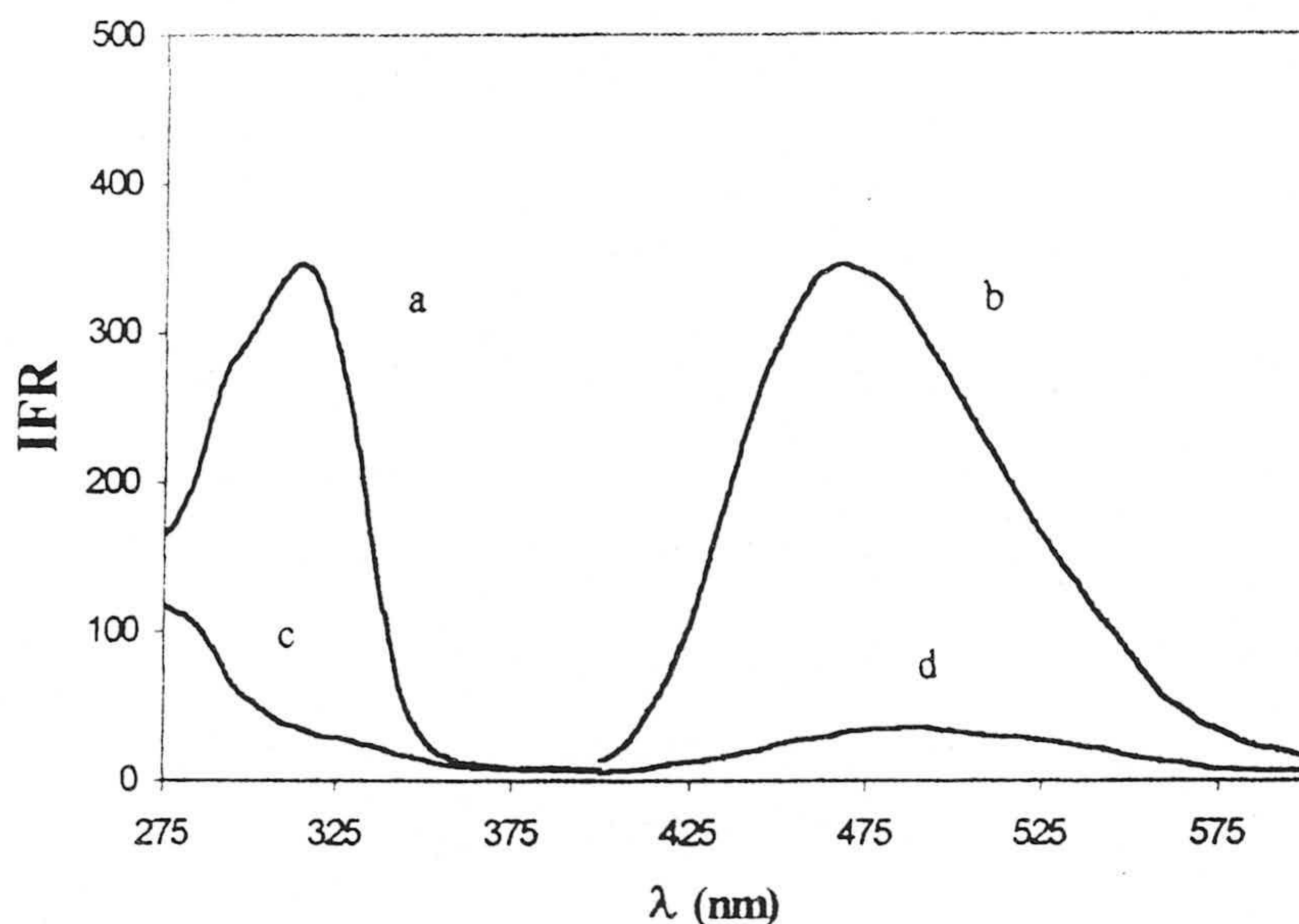


Figura 4.1. Espectros de excitación y emisión de la muestra WAR (a, b) y del blanco (c,d) en papel cromatográfico W4

4.2. OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES EXPERIMENTALES.

La optimización de cada una de las variables, tanto de la muestra como instrumentales, se llevó a cabo manteniendo constantes los valores de todas ellas, excepto el de aquella variable que se deseaba estudiar, estableciendo entonces su influencia sobre la intensidad de fosforescencia emitida por el analito. Procediendo

de esta forma se estudiaron las siguientes variables experimentales: influencia de la naturaleza del soporte sólido, influencia de la naturaleza, concentración y volumen del átomo pesado, influencia del oxígeno y de la humedad atmosférica, influencia del pH del medio y de la fuerza iónica, influencia del volumen de muestra depositada en el soporte sólido, tiempo de secado de la muestra y, finalmente, la influencia de las siguientes variables instrumentales: anchura de rendijas de excitación y emisión, tiempos de lectura del detector (t_g) y de retraso en su apertura (t_d).

4.2.1. Optimización de variables experimentales de la muestra.

Para optimizar las variables experimentales que intervienen en la preparación de la muestra y que pueden afectar a la emisión fosforescente se procedió a realizar un estudio sistemático de la influencia que estas variables pueden ejercer, utilizando para ello el máximo de fosforescencia del espectro de emisión registrado a 315 nm de excitación y bajo las restantes condiciones instrumentales anteriormente señaladas.

4.2.1.1. Elección del soporte sólido.

El primer objetivo que nos planteamos fue la elección del soporte sólido más adecuado. Con tal fin se seleccionaron, *a priori*, cinco tipos de soporte: papeles cromatográficos Whatman nº 1 y nº 4, papeles de cambio iónico Whatman P-81 (catiónico) y DE-81 (aniónico) y papel de filtro Albet N° 1305.

La forma de proceder para la preparación de las muestras fue la misma en todos los casos e igual a la descrita en los apartados anteriores, preparándose en cada caso el correspondiente blanco. Los datos obtenidos se recogen en la tabla 4.1.

Tabla 4.1 Influencia de la naturaleza del soporte sólido sobre la intensidad de fosforescencia

Tipo de soporte sólido	IF(muestra)	IF(blanco)	ΔIF
Papel Whatman N° 1	290,7	87,2	203,5
Papel Whatman N° 4	320,6	37,1	283,5
Papel Whatman P-81	205,5	55,5	150,0
Papel Whatman DE-81	186,6	106,3	80,3
Papel de Albet N° 1305	278,8	60,7	228,1

Los valores de intensidad de fosforescencia (IF) que figuran en esta tabla, son la media de tres determinaciones diferentes.

4.2.1.2. Selección del átomo pesado.

En el caso de la WAR se ensayaron una serie de metales pesados en formas de nitratos y acetatos, así como varios aniones voluminosos. Las especies químicas ensayadas fueron: Pb(II), Ag(I), Tl(I), y Hg(II) como cationes y halogenuros como aniones. Los resultados obtenidos son los que se incluyen en la tabla 4.2.

Tabla 4.2 Influencia de los metales pesados sobre la IF de la WAR

Metal	IFR(m)	DNR%	Halogenuro	IFR(m)	DNR(%)
sin	32,0	4,8	F ⁻	90,2	4,2
Pb(II)	259,4	4,2	Cl ⁻	100,5	3,4
Tl(I)	208,5	2,9	Br ⁻	153,3	3,1
Hg(II)	71,5	3,2	I ⁻	277,5	2,2
Ag(I)	55,2	4,0			

IFR: Intensidad de fosforescencia relativa.

DNR (%): Desviación normal relativa.

Si comparamos los resultados reflejados en la tabla anterior podemos concluir que en dos casos se observa una intensidad de fosforescencia relativa mayor que en el resto, estos son los que utilizan Pb(II) y I⁻ como átomo pesado.

Especie	IF _(blanco)	IFR(m)	σ_{n-1}	DNR%
Pb(II)	102,3	259,3	10,7	4,2
I ⁻	37,4	277,3	6,3	2,2

Se eligió el yoduro como átomo pesado para las posteriores experiencias ya que, como podemos apreciar en la anterior tabla, produce la máxima fosforescencia con la mínima desviación normal de las medidas.

4.2.1.3. Influencia de la concentración de la disolución de yoduro.

Una vez elegido el yoduro como especie más apropiada para incrementar la emisión fosforescente, se procedió al estudio de la influencia que sobre esta pueda ejercer la concentración de la disolución de yoduro. Para ello se realizó una experiencia en la que se midió la señal de fosforescencia emitida por distintas muestras preparadas con diferentes concentraciones de KI comprendidas entre 0,15 y 3,0 mol.L⁻¹. Tanto las muestras como sus respectivos blancos, fueron preparadas y medidas en las condiciones que hemos venido utilizando hasta este momento.

Los datos obtenidos, que están incluidos en la tabla 4.3 y representados en la figura 4.2, son la media de tres réplicas independientes para cada uno de los casos, lo que nos permite obtener el valor de la desviación normal relativa que figura en la última columna de la citada tabla.

Figura 4.2. Influencia de la concentración del KI.

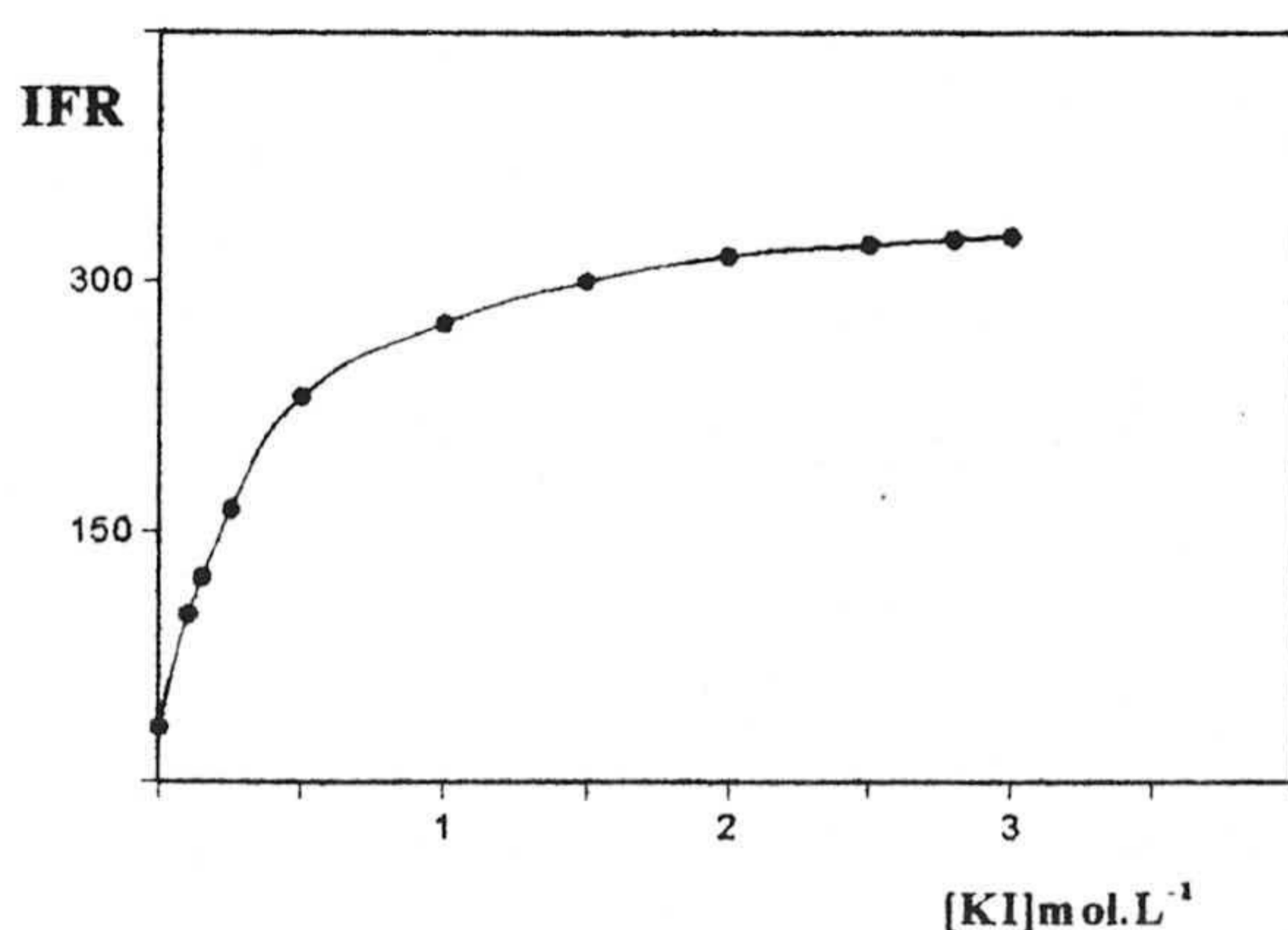


Tabla 4.3.

KI	IFR	DNR %	KI	IFR	DNR %
0,00	32,3	4,8	1,50	300,0	1,9
0,10	100,0	5,0	2,00	315,5	2,0
0,15	122,3	3,4	2,50	322,0	2,9
0,25	163,0	3,1	2,80	325,0	1,5
0,50	230,3	3,3	3,00	327,0	2,2
1,00	275,9	2,5			

De los resultados obtenidos podemos deducir que la intensidad de fosforescencia aumenta al aumentar la concentración de la disolución de átomo pesado hasta alcanzar un valor máximo para una concentración 2 M a partir de la cual la señal analítica permanece prácticamente constante. Este valor se utilizó para posteriores experiencias.

4.2.1.4. *Influencia del volumen de la disolución de átomo pesado*

Con objeto de determinar el volumen óptimo de disolución de átomo pesado necesario para obtener la máxima intensidad de fosforescencia, se prepararon distintas muestras en las que el volumen de disolución de KI variaba hasta un valor máximo de 7,0 μL de disolución 2M de KI. Los resultados obtenidos correspondientes a tres réplicas en cada uno de los casos, se resumen en la tabla 4.4 y se representan en la figura 4.3 donde también figuran las desviaciones normales de las tres réplicas de cada muestra.

Figura 4.3. Influencia del volumen de disolución de KI.

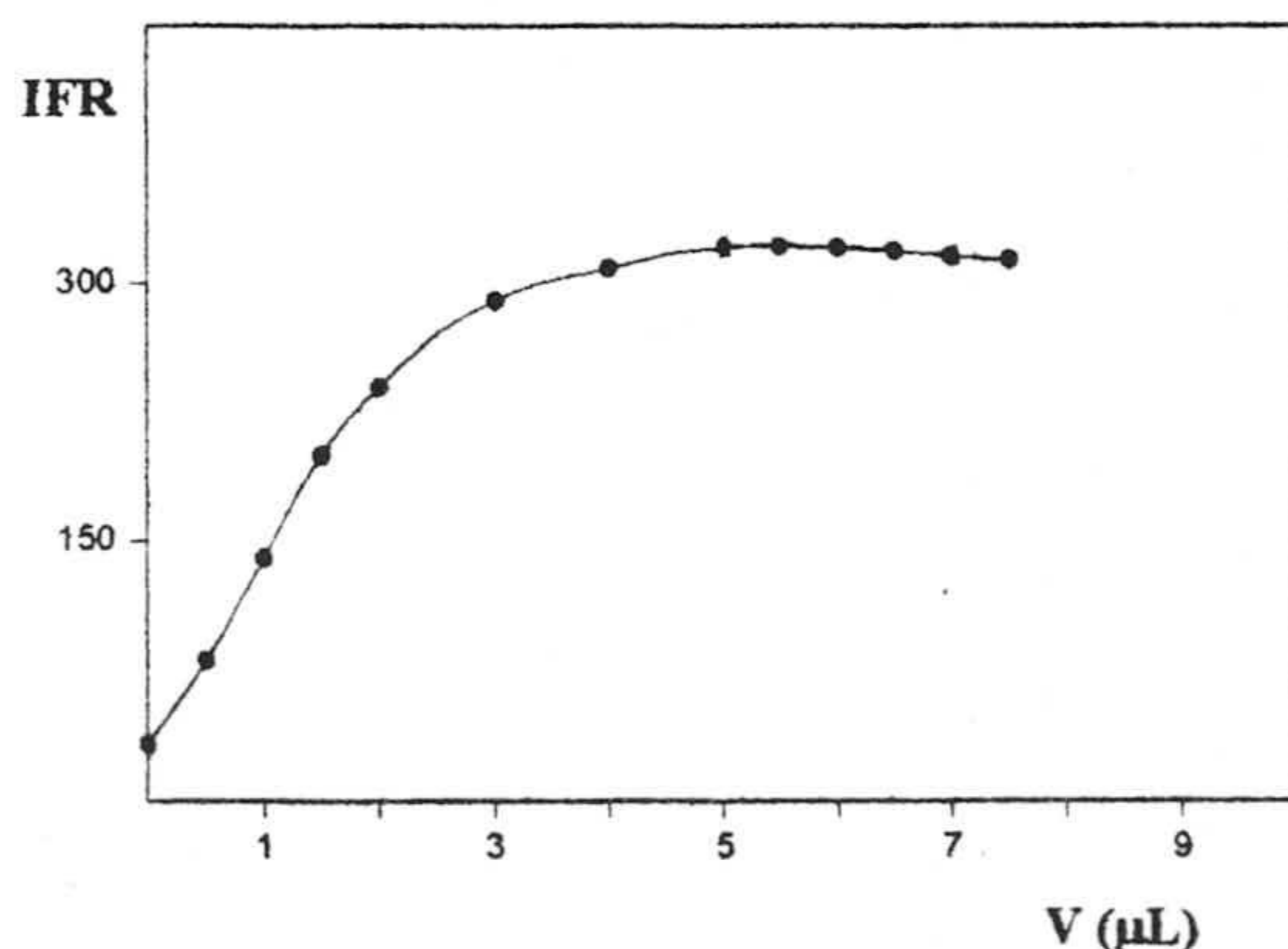


Tabla 4.4.

V (μL)	IFR	DNR %	V (μL)	IFR	DNR %
0,0	32,3	4,3	5,0	321,5	2,1
0,5	80,6	3,2	5,5	322,5	2,0
1,0	140,5	3,3	6,0	321,7	2,3
1,5	200,3	2,4	6,5	319,8	1,8
2,0	240,8	2,0	7,0	316,9	2,0
3,0	290,9	2,4	7,5	314,8	2,2
4,0	309,6	1,6			

Los resultados obtenidos en esta experiencia indican que la señal de fosforescencia emitida crece significativamente al aumentar el volumen de la disolución

del átomo pesado hasta alcanzar un valor para 5 μL , a partir del cual la fosforescencia permanece constante e incluso desciende levemente. Para posteriores experiencias se ha fijado el volumen de disolución de átomo pesado en 5 μL .

4.2.1.5. Influencia del uso de láminas de cuarzo sobre la intensidad de fosforescencia.

Como se ha indicado anteriormente, la presencia de oxígeno y humedad atmosféricos produce una disminución de la señal de fosforescencia; por ello en esta Memoria proponemos el uso de láminas de cuarzo para evitar, o al menos paliar en lo posible, este efecto. Para probar la influencia del uso de las láminas de cuarzo se realizaron cuatro experiencias: a) en presencia de oxígeno atmosférico sin utilizar las láminas de cuarzo, b) utilizando las láminas en presencia de oxígeno, c) sin láminas de cuarzo pero efectuando las medidas bajo una atmósfera inerte y seca de N_2 y d) utilizando tanto atmósfera de N_2 como las láminas de cuarzo. En todos los casos las muestras fueron preparadas en la forma descrita con anterioridad y se midieron bajo las condiciones instrumentales ya señaladas. Los resultados obtenidos están incluidos en la tabla 4.5.

De los resultados obtenidos podemos deducir que la utilización de láminas de cuarzo incrementa sensiblemente la señal de fosforescencia producida por el analito tanto en atmósfera inerte de N_2 como sin ella, al menos durante los primeros 7 minutos desde la preparación de la muestra. Este hecho nos permite realizar las medidas de fosforescencia sin necesidad de utilizar la atmósfera inerte siempre que la medida se efectúe dentro de dicho intervalo de tiempo.

Tabla 4.5.

T(min)	IFR CSN	IFR CCN	IFR SCN	IFR SSN	T(min)	IFR CSN	IFR CCN	IFR SCN	IFR SSN
0	324	335	160	157	16	274	317	150	120
2	328	337	162	157	18	261	310	147	115
4	325	338	164	155	20	250	303	143	105
6	320	337	163	150	22	240	295	140	95
8	315	336	162	145	24	230	291	137	86
10	308	333	160	141	26	220	285	133	77
12	299	329	157	134	28	210	280	128	70
14	286	325	154	127	30	200	282	122	62

CCN: Con láminas de cuarzo y N₂. *CSN: Con láminas de cuarzo y sin N₂. *SCN: Sin láminas de cuarzo y con N₂. *SSN: Sin láminas de cuarzo ni N₂

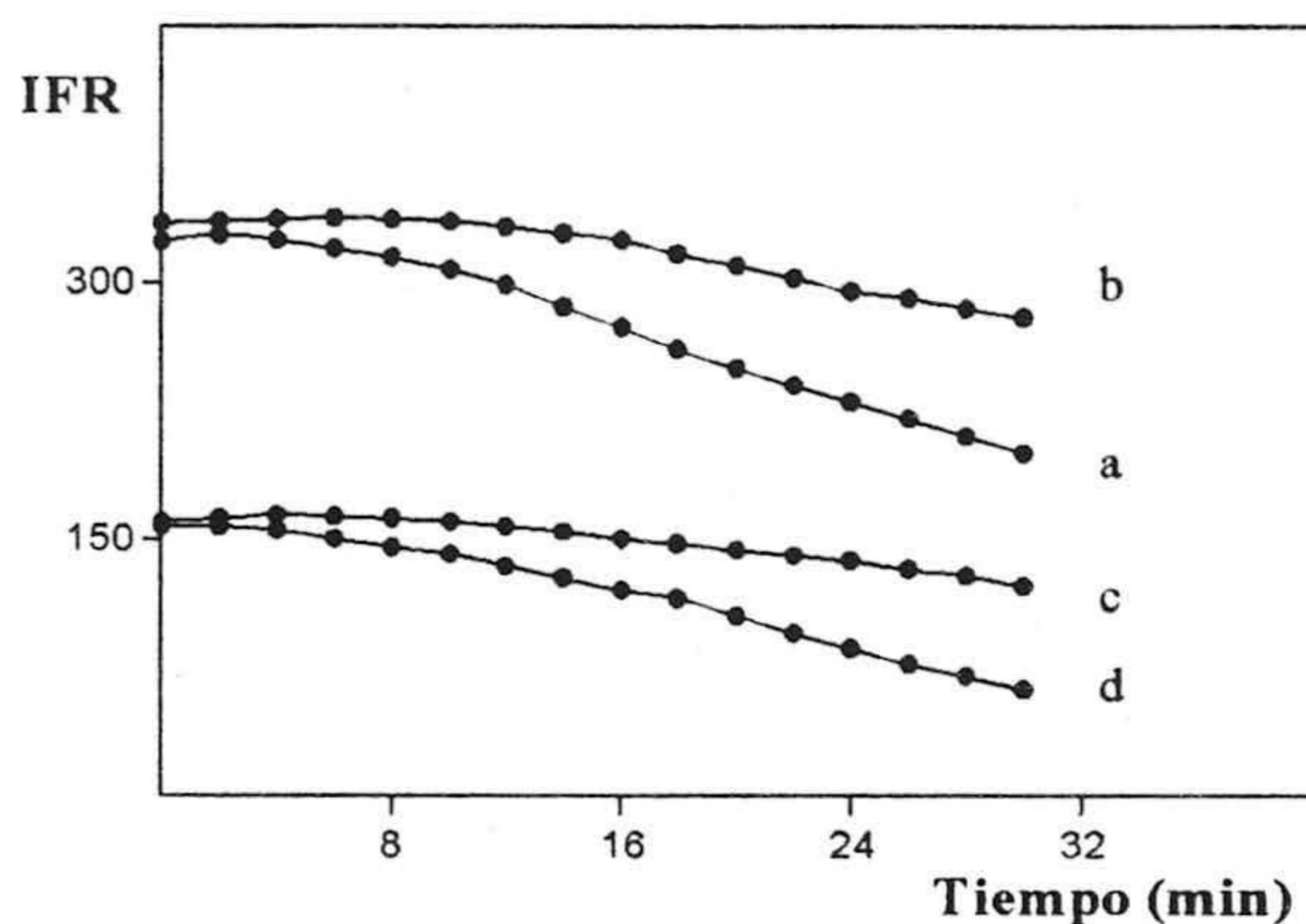


Figura 4.4. Intensidad de fosforescencia:
 (a) Con láminas sin N₂.
 (b) Con láminas y N₂.
 (c) Sin láminas con N₂.
 (d) Sin láminas ni N₂.

4.2.1.6. Influencia del pH del medio

Con el fin de determinar la influencia del pH de la disolución de analito sobre la intensidad de fosforescencia emitida se preparó una serie de disoluciones de analito en las que el pH variaba entre 0,5 y 13,5 utilizando para ello disoluciones de HCl y NaOH de diferentes concentraciones y manteniendo las mismas condiciones experimentales anteriormente reseñadas. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 4.6, y se representan en la figura 4.5.

Figura 4.5. Influencia del pH

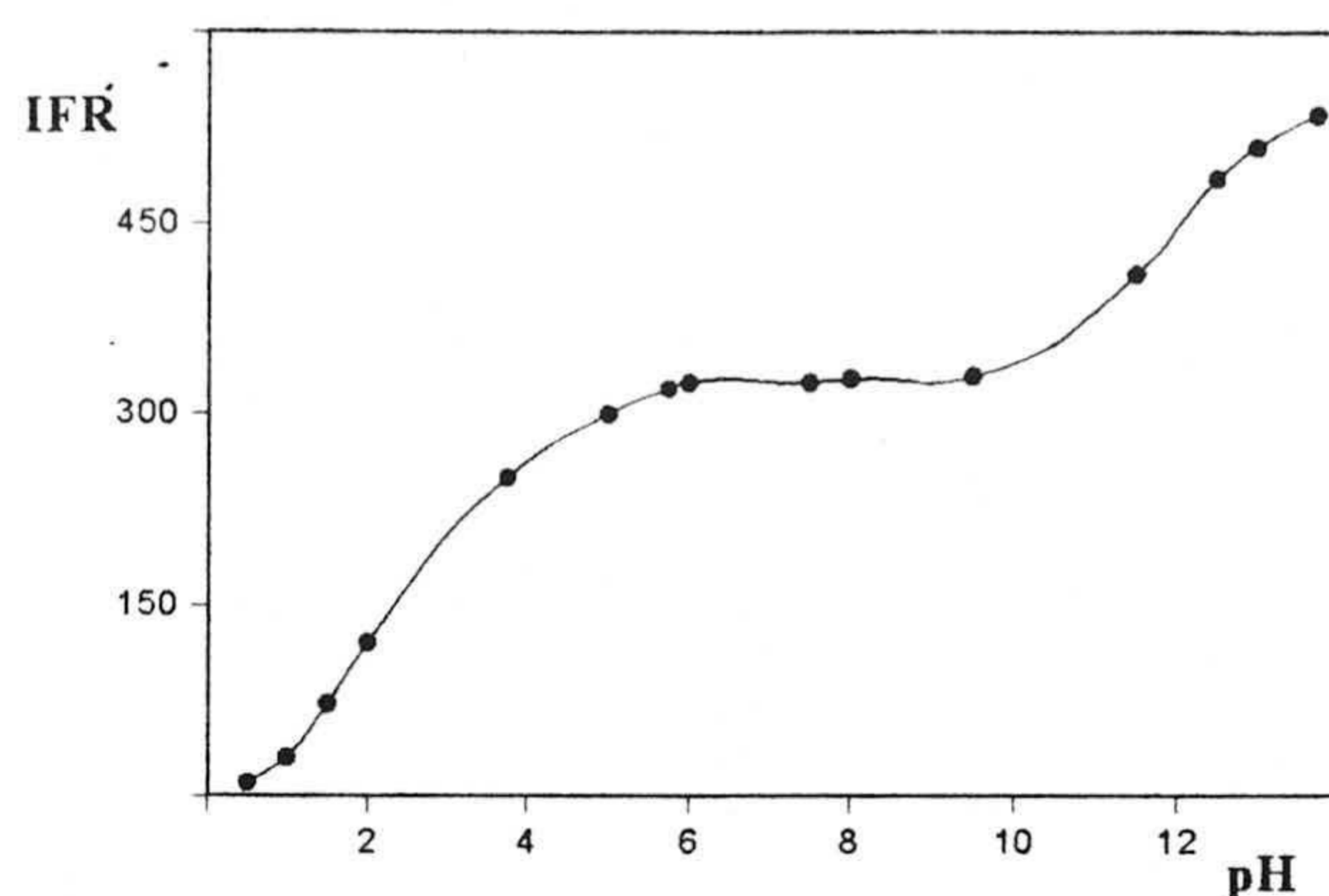


Tabla 4.6.

pH	IFR	pH	IFR
0,50	10,0	7,20	322
1,00	30,0	8,00	325
1,50	72,0	9,50	330
2,00	120	11,25	400
3,75	230	12,50	485
4,50	279	13,00	510
5,50	320	13,50	535
6,00	325		

Como se observa en la figura la IFR crece desde $\text{pH} = 0,5$ hasta $\text{pH} = 5,5$. Desde este valor hasta $\text{pH} = 9,5$ la intensidad fosforescente relativa se mantiene constante y a partir de este punto aumenta hasta el valor máximo estudiado que es 13,5. Este aumento en la intensidad de fosforescencia con el pH cabe atribuirlo a la disociación del grupo fenólico presente en la molécula de warfarina, grupo que presenta un valor de pK_a en torno a 12. Por ello se trabajara en medio básico ajustado con NaOH.

2.1.7. Influencia de la concentración de NaOH

Para estudiar la influencia de esta variable se prepararon muestras que contenían 5 μL de KI 2M, 2,5 μL de WAR de 4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y 10 μL de la disolución de NaOH de concentraciones comprendidas entre 0,01 y 1,0 M. Los resultados obtenidos utilizando tres réplicas diferentes se resumen en la tabla 4.7 y representan en la figura 4.6.

La observación de la figura 4.6 pone de manifiesto que hay un aumento inicial de la señal analítica al aumentar la concentración de NaOH, manteniéndose

prácticamente constante dicha intensidad fosforescente para concentraciones mayores de 0,3 M. Se eligió para experiencias posteriores una concentración de NaOH de 0,5 M.

Figura 4.6. Influencia de la concentración de NaOH sobre la IFR de la WAR.

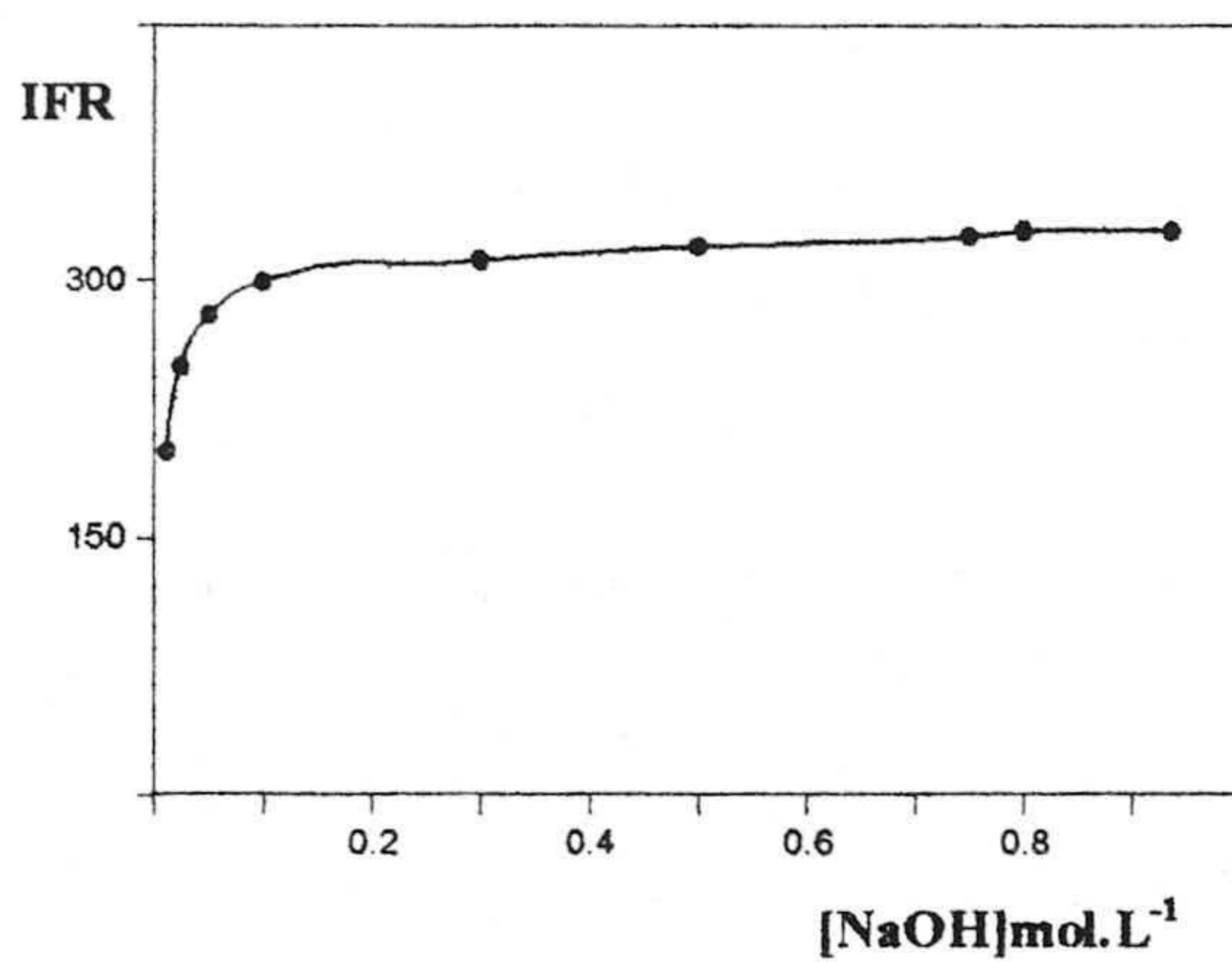


Tabla 4.7.

[NaOH] M	IFR	DNR(%)
0,010	210,5	2,3
0,025	250,5	3,0
0,050	282,7	2,9
0,100	302,6	2,1
0,200	310,0	1,9
0,300	321,2	2,3
0,400	327,7	3,1
0,500	328,9	1,8
0,750	330,5	2,5
1,000	328,7	3,3

4.2.1.8. Influencia del orden de adición de los reactivos.

El orden de adición de los reactivos NaOH, átomo pesado y analito juega a veces un papel muy importante en la emisión de fosforescencia y para saber el adecuado orden se realizaron experiencias cambiando el orden de adición de todas las formas posibles.

Tabla 4.8. Influencia del orden de adición de reactivos.

Orden	IFR	IFR%
NaOH + Yoduro + Warfarina	92	100
Yoduro + NaOH + Warfarina	32	35
Warfarina + NaOH + Yoduro	27	29
NaOH + Warfarina + Yoduro	19	21
Warfarina + Yoduro + NaOH	11	12
Yoduro + Warfarina + NaOH	4	4

IFR: Intensidad fosforescente relativa.

IFR%: Porcentaje de IFR referido a la máxima (92) tomada como 100%.

La anterior tabla pone de manifiesto que NaOH + yoduro + warfarina es el orden más adecuado para obtener la máxima intensidad de fosforescencia. En todo caso es necesario que el hidróxido sódico se encuentre ya sobre el soporte antes de la adición de warfarina para poder así conseguir la formación de la sal sódica y su posterior adsorción.

4.2.1.9. Influencia de la fuerza iónica

Con el fin de conocer la influencia de la fuerza iónica sobre la intensidad fosforescente de la WAR hemos empleado cloruro sódico como electrolito. Para ello se prepararon varias disoluciones en las cuales, manteniendo constantes todas las demás variables, se pusieron cantidades crecientes de NaCl hasta un valor máximo de 2,0 M. Los resultados experimentales obtenidos a partir de tres determinaciones diferentes son los que figuran en la tabla 4.9, donde podemos apreciar que la presencia de NaCl hasta concentración 2,0 M no influye sobre la intensidad fosforescente

Tabla 4.9.

[NaCl]M	IFR	DNR(%)	[NaCl]M	IFR	DNR(%)
0,000	316,3	1,1	0,800	316,0	1,3
0,025	316,1	3,0	1,000	314,0	1,6
0,050	314,5	1,5	1,200	316,6	2,0
0,100	316,3	0,9	1,400	317,3	3,4
0,200	313,9	1,2	1,600	315,5	2,1
0,400	317,2	3,0	1,800	313,6	1,1
0,600	315,5	3,3	2,000	316,8	1,8

4.2.1.10. Influencia del volumen de muestra depositada en el papel.

Para estudiar la influencia esta variable se prepararon diferentes muestras en las que el volumen de muestra depositado sobre el soporte sólido variaba entre 0,5 y

5,0 μL , manteniendo constantes las restantes variables experimentales. Los resultados obtenidos de tres determinaciones diferentes se resumen en la tabla 4.10.

Figura 4.7. Influencia del volumen de muestra depositada sobre la IFR de la WAR.

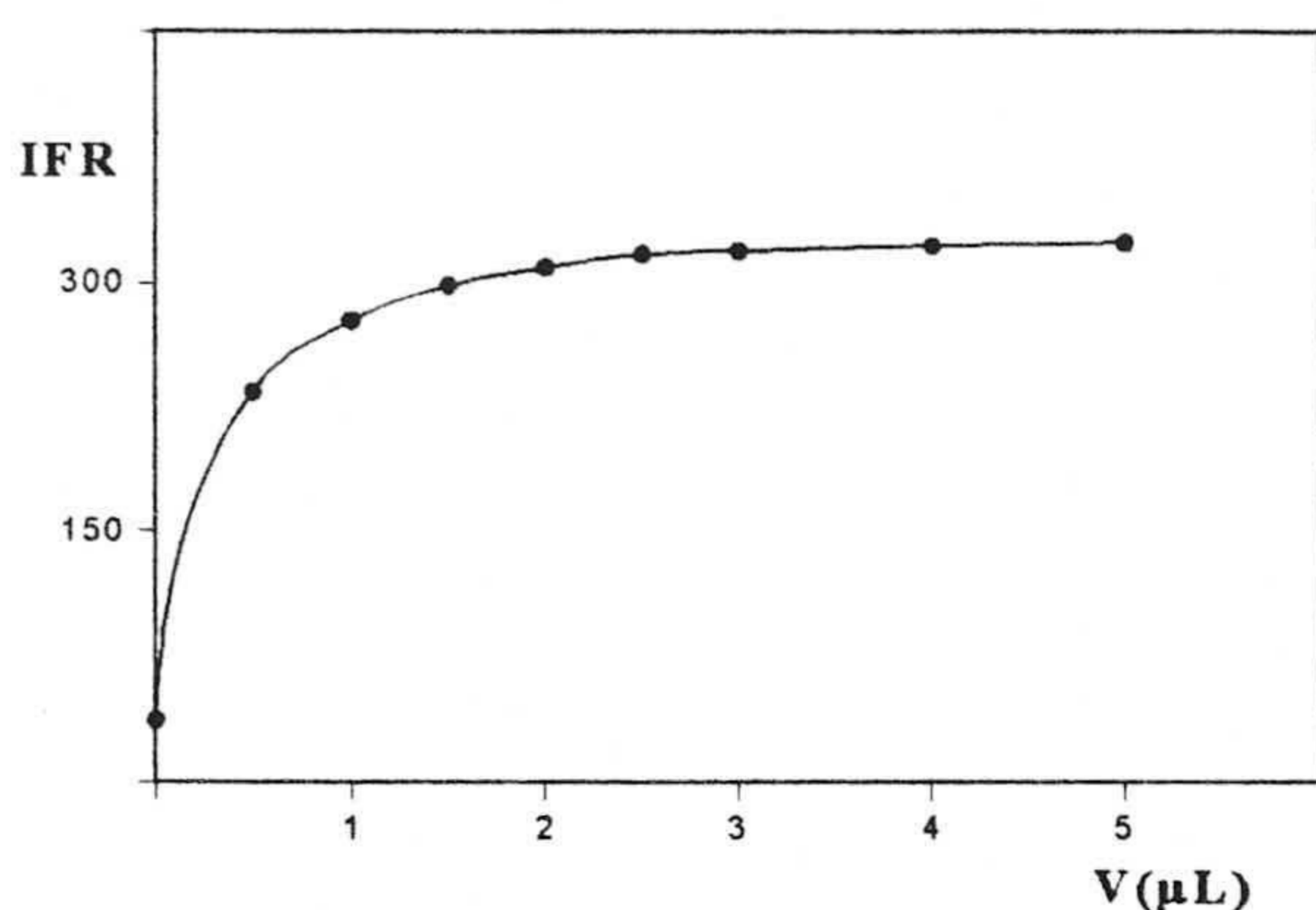


Tabla 4.10.

V (μL)	IFR	DNR (%)
0,0	37,3	3,5
0,5	234,3	4,5
1,0	277,3	1,6
1,5	298,7	2,6
2,0	309,3	2,2
2,5	316,9	1,7
3,0	318,8	1,6
4,0	322,0	2,1
5,0	324,4	0,9

Como conclusión se puede decir que 2,0 μL de disolución de WAR son suficientes para cubrir la superficie irradiada por el haz de excitación y que producen una intensidad de fosforescencia máxima ya que a partir de este valor se mantiene prácticamente constante.

4.2.1.11. Influencia del tiempo de secado

Uno de los parámetros experimentales que pueden influir y ejercer un papel importante sobre la intensidad de fosforescencia es el tiempo de secado de la muestra una vez depositada sobre el soporte sólido. Para comprobar la influencia de este parámetro, se realizó una experiencia en la que se midió la señal de fosforescencia transmitida para distintas muestras secadas bajo una corriente de aire caliente, utilizando para ello un secador de pelo doméstico, durante distintos periodos de tiempo que abarcan desde 0,5 hasta 8 minutos con una potencia de 250

vativos, situando el secador a una altura de 10 cm sobre la muestra. Los datos obtenidos en tres determinaciones diferentes se resumen en la tabla 4.11 y se representan en la figura 4.8

Figura 4.8: Influencia del tiempo de secado

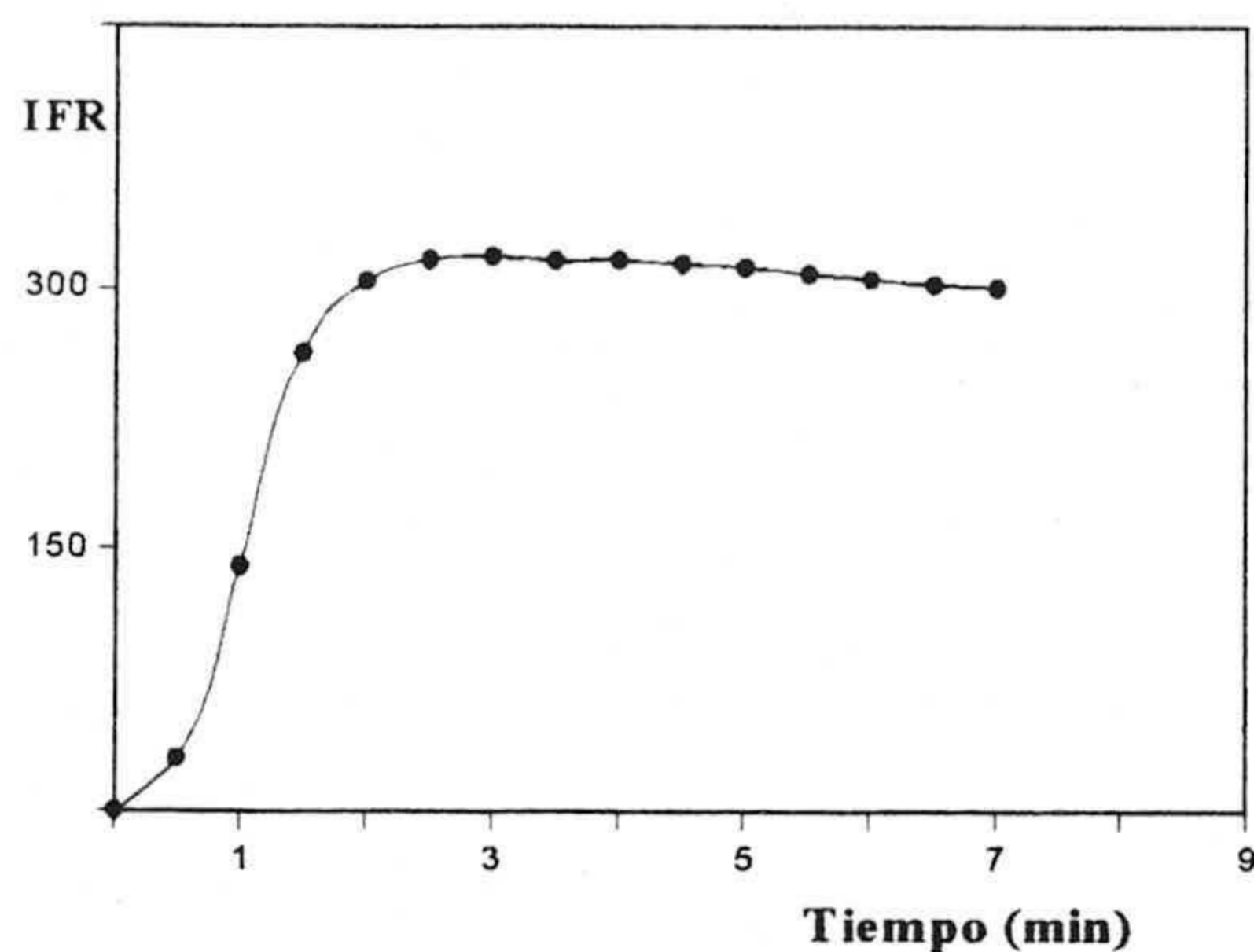


Tabla 4.11.

T (min)	IFR	DNR %	T (min)	IFR	DNR %
0,5	30	4,2	4,0	316	3,0
1,0	140	3,4	4,5	314	1,9
1,5	263	3,0	5,0	312	2,1
2,0	304	3,0	5,5	308	2,0
2,5	316	2,2	6,0	305	2,6
3,0	318	2,0	7,0	302	1,8
3,5	316	2,5			

A la vista de los resultados representados en la gráfica anterior podemos decir que la señal de fosforescencia crece con el tiempo de secado hasta alcanzar un valor máximo a los 3 minutos, a partir del cual permanece prácticamente estable. Para posteriores experiencias se fijó el tiempo de secado en 3 minutos.

4.2.2. Optimización de variables instrumentales.

Los parámetros instrumentales estudiados son: tiempos de retraso (t_d) y de lectura del detector (t_g), y anchura de las rendijas de excitación y emisión.

4.2.2.1. Optimización de las rendijas de excitación y emisión.

Para optimizar los valores correspondientes a las anchuras de las rendijas de excitación y emisión se registraron los espectros de emisión de diferentes muestras preparadas en la forma indicada en experiencias anteriores. Las medidas de intensi-

dad de fosforescencia se realizaron a $\lambda_{exc} = 315$ nm, $\lambda_{em} = 468$ nm variando alternativamente las rendijas de emisión y excitación y manteniendo constantes los demás parámetros instrumentales. De los resultados obtenidos se deduce que 2,5 y 10 nm, para excitación y emisión respectivamente, son los valores más favorables, motivo de la utilización de dichos valores para posteriores experiencias.

4.2.2.2. Optimización de los tiempos de retraso y de lectura del detector.

Para el estudio de estas variables se procedió de forma similar a la del apartado anterior, midiendo la intensidad de fosforescencia para tiempos de retraso (t_d) comprendidos entre 0,1 y 0,3 ms y tiempos de lectura del detector (t_g) comprendidos entre 1 y 12 ms. El valor mínimo de t_d fué de 0,1 ms porque corresponde al pulso de la lámpara de xenón instalada en el instrumento y el tiempo máximo de lectura del detector (t_g) es de 12 ms porque también está impuesto por las características técnicas del propio instrumento. Los resultados obtenidos en esta experiencia se resumen en la tabla 4.12.

Tabla 4.12. Influencia de t_g y t_d sobre la IFR

t_d (ms)	t_g (ms)	IFR	t_d (ms)	t_g (ms)	IFR	t_d (ms)	t_g (ms)	IFR
0,1	6	210,5	0,2	6	210,6	0,3	6	215,4
0,1	8	231,5	0,2	8	241,5	0,3	8	229,9
0,1	10	284,4	0,2	10	279,6	0,3	10	287,7
0,1	12	316,6	0,2	12	310,9	0,3	12	307,8

De los resultados obtenidos de esta experiencia, resumidos en la tabla anterior, se puede deducir que al aumentar el tiempo de lectura del detector, manteniendo constante el tiempo de retraso, aumenta la intensidad fosforescente emitida observándose un incremento similar en todas los casos, mientras que al aumentar el tiempo de retraso, manteniendo constante el tiempo de la lectura del detector, la

intensidad fosforescente emitida es prácticamente la misma cualquiera que sea el valor de t_d . En consecuencia hemos elegido los valores de $t_g = 12$ ms y $t_d = 0,10$ ms como valores óptimos ya que con ellos se observa la mayor emisión fosforescente.

4.3. PROCEDIMIENTO OPERATORIO

Tras la optimización de las variables experimentales, que afectan a la intensidad de fosforescencia emitida por el analito, podemos establecer el siguiente procedimiento operatorio para la preparación de la muestra y condiciones de medida: sobre una tira de papel Whatman nº 4 de (4,5x1,2 cm) se depositan 10 μ L de disolución de NaOH (0,5M), 5 μ L de disolución de KI (2M) y 2,5 μ L de disolución hidroalcohólica etanol/agua 10% v/v de muestra de WAR. A continuación se seca la muestra mediante una corriente de aire caliente durante un periodo de tiempo de tres minutos, se coloca la tira de papel entre dos láminas de cuarzo y se introduce en el compartimento de muestras del instrumento formando un ángulo de 45° con el haz de excitación. La intensidad de fosforescencia transmitida a temperatura ambiente se mide a $\lambda_{exc} = 315$ nm, $\lambda_{em} = 468$ nm, para $t_g = 12$ ms y $t_d = 0,1$ ms y rendijas de excitación y emisión de 2,5 y 10 nm respectivamente.

4.4. ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE CONCENTRACIÓN Y SEÑAL ANALÍTICA.

Para saber como varía la intensidad de fosforescencia en función de la concentración de WAR, se realizó la siguiente experiencia: en una serie de matraces aforados de 25 mL de capacidad se introdujeron cantidades crecientes de disolución de WAR de 100 mg·L⁻¹ de concentración y enrasando con etanol/agua 10% v/v De cada uno de los matraces se prepararon tres muestras replicadas indepen-

dientes, en la forma indicada en el apartado anterior y se procedió a la lectura de sus respectivas emisiones fosforescentes. Los datos obtenidos se resumen en la tabla 4.13 y se representan en la figura 4.9.

Figura 4.9. Influencia de la concentración de WAR.

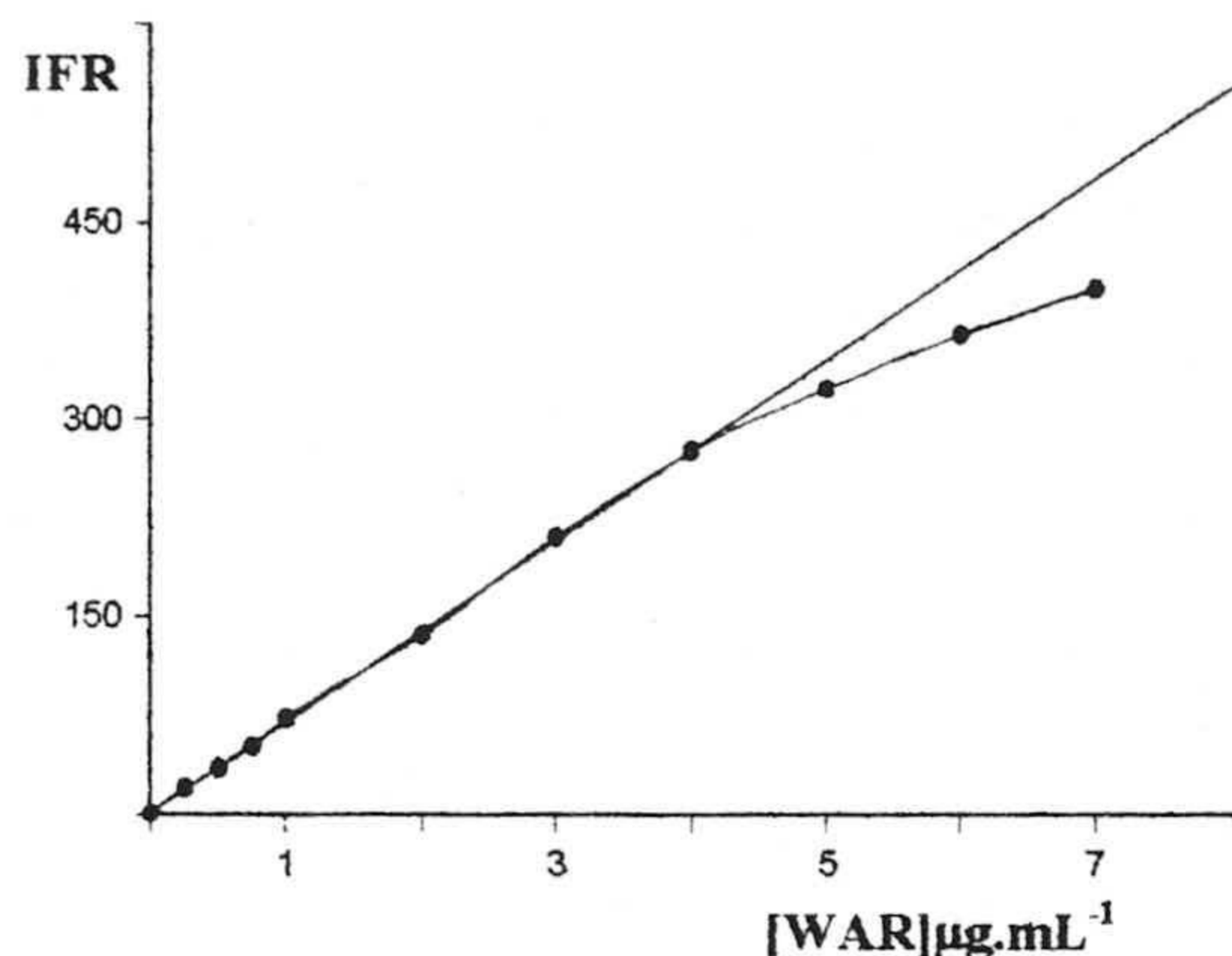


Tabla 4.13.

[WAR] μg.mL ⁻¹	IFR	[WAR] μg.mL ⁻¹	IFR
0,00	0,0	3,00	216,4
0,25	1,1	4,00	276,6
0,50	34,4	5,00	323,9
0,75	50,8	6,00	380,8
1,00	72,3	7,00	434,4
2,00	136,5		

De los datos de la figura anterior se deduce que hay una relación lineal entre la intensidad fosforescente transmitida a temperatura ambiente y la concentración de WAR hasta un valor de 4,00 μg.mL⁻¹. Para valores superiores de concentración la relación no es lineal ya que la desviación de la curva experimental respecto de la linealidad teórica es superior al 5%, valor este que hemos tomado como límite superior de la zona de linealidad.

Tabla 4.14. Resumen de los valores óptimos de las variables experimentales.

Variables	Valor óptimo	Variables	Valor óptimo
Soporte sólido	Papel W ₄	λ _{exc}	315nm
Átomo pesado	I ⁻	λ _{em}	468 nm
[KI]	2 M	Rendija excitación	2,5 nm
V de KI 2M	5 μL	Rendija emisión	10 nm
V de NaOH 0,5M	10 μL	t _d	0,1 ms
V de muestra	2,5 μL	t _g	12 ms
Tiempo de secado	3 min	Ángulo de incidencia	45°

4.5. PARÁMETROS ANALÍTICOS.

4.5.1. Recta de calibrado

Para establecer la recta de calibrado, se preparó una serie de matraces aforados de 25 mL en los que introdujeron cantidades crecientes de disolución patrón de warfarina de 100 mg.L^{-1} de concentración y etanol absoluto/agua destilada (10% v/v) hasta el enrase. A continuación, de cada una de estas disoluciones, se prepararon tres muestras replicadas de acuerdo con el procedimiento operatorio establecido y se midieron sus intensidades de fosforescencia. Los resultados experimentales obtenidos se incluyen en la tabla 4.15 y de ellos se obtuvo la recta de calibrado que representamos en la figura 4.10.

Figura 4.10. Recta de calibrado

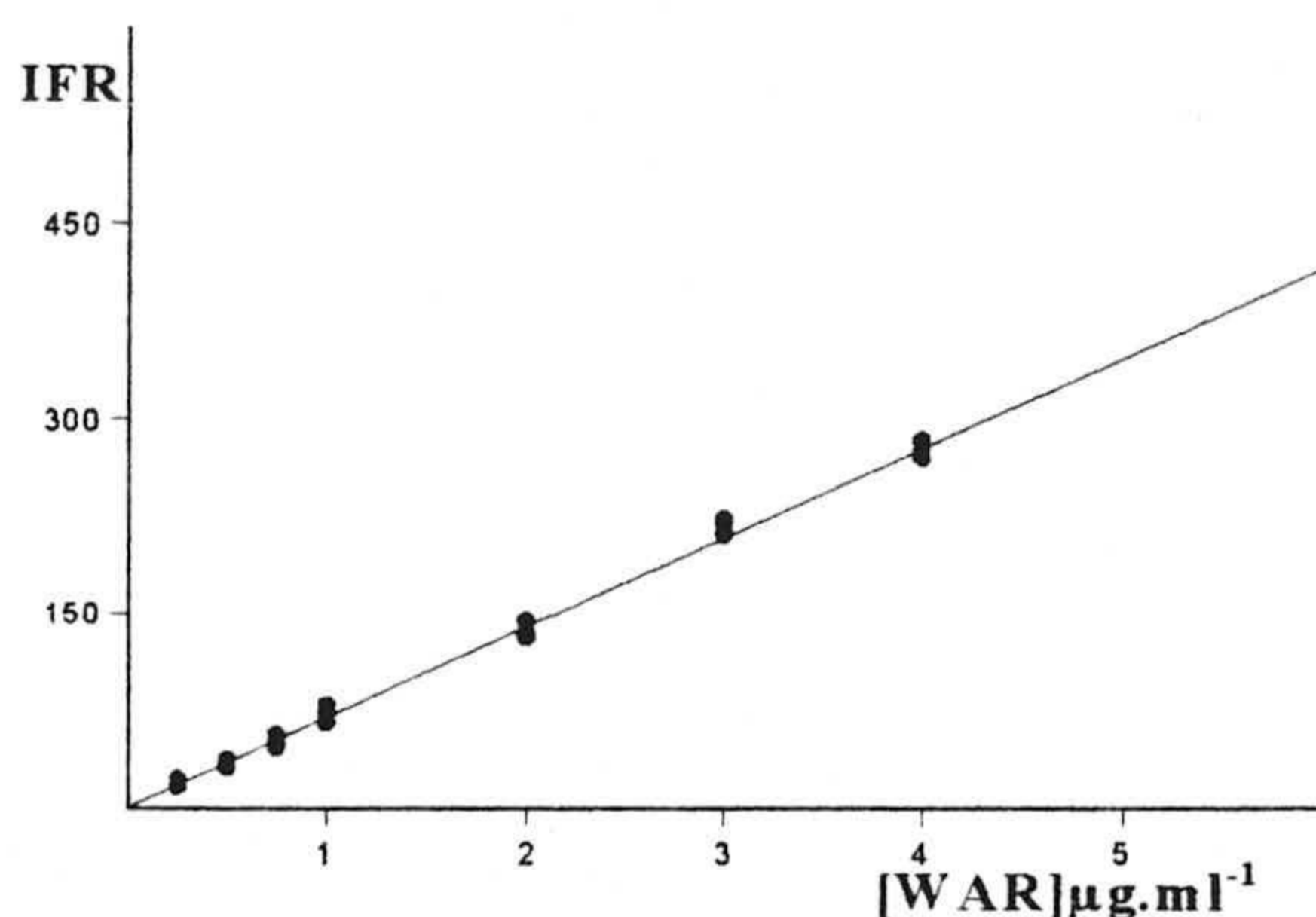


Tabla 4.15.

[WAR] $\mu\text{g.mL}^{-1}$	IFR (tres replicas)		
	0,25	18,54	22,24
0,50	37,34	31,63	34,3
0,75	49,73	46,92	55,9
1,00	72,54	78,81	65,6
2,00	13,1	143,9	134,6
3,00	216,7	222,6	210,5
4,00	275,5	270,2	282,8

Mediante el programa informático Statgraphics se obtuvieron los parámetros estadísticos que figuran en la tabla 4.16.

El test de fallo ajuste demuestra que hay un buen ajuste del modelo de regresión lineal a los datos experimentales ya que $p > 5\%$ ($p = 35.22\%$) para un nivel de confianza del 95%. También de la representación gráfica de los residuales frente

a la concentración de warfarina se obtiene una distribución aleatoria de los residuales. Por lo que podemos decir que el análisis de la varianza (ANOVA) realizado en el intervalo lineal comprendido entre 0,250 y 4,00 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ pone en manifiesto el buen ajuste lineal del modelo y la ausencia de curvatura.

Tabla 4.16. Valores de los parámetros Estadísticos del calibrado.

Parámetros	Valores encontrados
n	21
m	3
a	0,902
b	69,85
S _a	2,00
S _b	0,954
S _{R,C}	5,72
P _{R,C} (lack-of-fit)	35,22
R ²	0,9965

m: n° de réplicas de cada muestra.
 n: n° de muestras.
 a: Ordenada en el origen.
 b: Pendiente
 S_a: Desviación normal de la ordenada en el origen.
 S_b: Desviación normal del pendiente.
 R: Coeficiente de correlación.
 R²: Coeficiente de determinación.
 S_{R,C}: Desviación normal de regresión.
 P_{R,C}: Nivel de significación para el test de fallo de ajuste (lack of fit).

Tabla 4.17. Resultados del ANOVA correspondiente a los datos de la tabla .

Fuente	S.C	g.l	M.C	F _{exp}	P(%)
Modelo	175374,33	1	175374,33	5360,5	0,00000
Residuales	621,604	19	32,716		
Fallo de ajuste	188,18	5	37,64	1,216	35,22
Error puro	433,43	14	30,96		
Total	175995,93	20			

S.C: Suma de cuadrado.

M.C: Media de cuadrado.

Una vez que se comprueba homoscedasticidad y admitiendo que se cumplen las hipótesis matemáticas del modelo de mínimos cuadrados (normalidad, aleatoriedad e independencia) se obtiene la siguiente función de calibrado.

$$\text{IFR} = 69,85[\text{WAR}] + 0,902$$

donde [WAR] está medida en $\mu\text{g.ml}^{-1}$

4.5.2. Linealidad: $\text{Lin}(\%) = [1 - \text{DNR}(b)] \times 100 = [1 - 0,0286] \times 100 = 97,14 \%$
 donde $\text{DNR}(b) = S_b/b = 2,00/69,85 = 0,0286$

4.5.3. Sensibilidad: a) Sensibilidad de calibrado: $S_{\text{cal}} = b = 69,85 (\mu\text{g}/\text{ml})^{-1}$.

b) Sensibilidad analítica: $S_{\text{anal}} = S_{R,C}/b = 5,72/69,85 = 0,0819$
 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$

4.5.4. Límites Detección y cuantificación.

Se prepararon 10 disoluciones blanco, que contienen todos los reactivos, excepto el analito, y se midieron sus señales de fosforescencia obteniéndose los resultados que se resumen en la tabla 4.18.

Tabla 4.18. Repetibilidad del blanco

blanco	IF
1	36,8
2	37,2
3	36,5
4	38,5
5	39,0
6	36,5
7	35,3
8	35,7
9	37,1
10	38,4

$\bar{X} = 37,4$ $S_{n-1} = 1,2$ $\text{DER} = 3,2\%$

\bar{X} = Valor medio de la señal de los blancos.

S_{n-1} = Desviación normal de los valores del blanco.

$\text{DNR}\%$ = Desviación normal relativa.

Para calcular los valores del límite de detección y el límite de cuantificación, se utilizaron los resultados obtenidos en la tabla 4.18 y las definiciones de límite de detección y límite de cuantificación admitido por IUPAC. Se obtuvieron los siguientes resultados:

Límite de detección: $\text{LD} = 3S_b/b = 0,052 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$

Límite de cuantificación: $\text{LQ} = 10S_b/b = 0,172 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$

4.5.5. Rango dinámico lineal

El intervalo de aplicación del método, está comprendido entre el límite inferior, que es el límite de cuantificación y el límite superior, calculado anteriormente mediante el test de fallo de ajuste; por lo tanto:

$$RDL = 0,1 \text{ Lim}_{sup}/\text{Lim}_{inf} = 0,1 (4,00/0,172) = 2,33$$

4.5.6. Precisión

La precisión se determinó mediante las dos formas establecidas en el capítulo 1, obteniéndose los siguientes resultados:

a) Repetibilidad del método propuesto aplicado a una muestra dada.

Se prepararon 10 disoluciones de WAR de $2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de concentración, y siguiendo la metodología de trabajo establecida se obtuvieron los resultados resumidos en la tabla 4.19, expresados como desviación estándar relativa

Tabla 4.19. Repetibilidad del método

Muestra	IFR	Muestra	IFR
1	134,5	6	130,5
2	134,5	7	133,3
3	142,0	8	134,0
4	130,9	9	132,0
5	139,0	10	133,5

$\bar{x} = 134,42$ $S_{n-1} = 3,56$ $DNR = 2,65\%$
--

b) Repetibilidad del método a partir de los datos del calibrado.

En la tabla 4.20 se indican los valores de la precisión en función de la concentración y se representan en la figura 4.11.

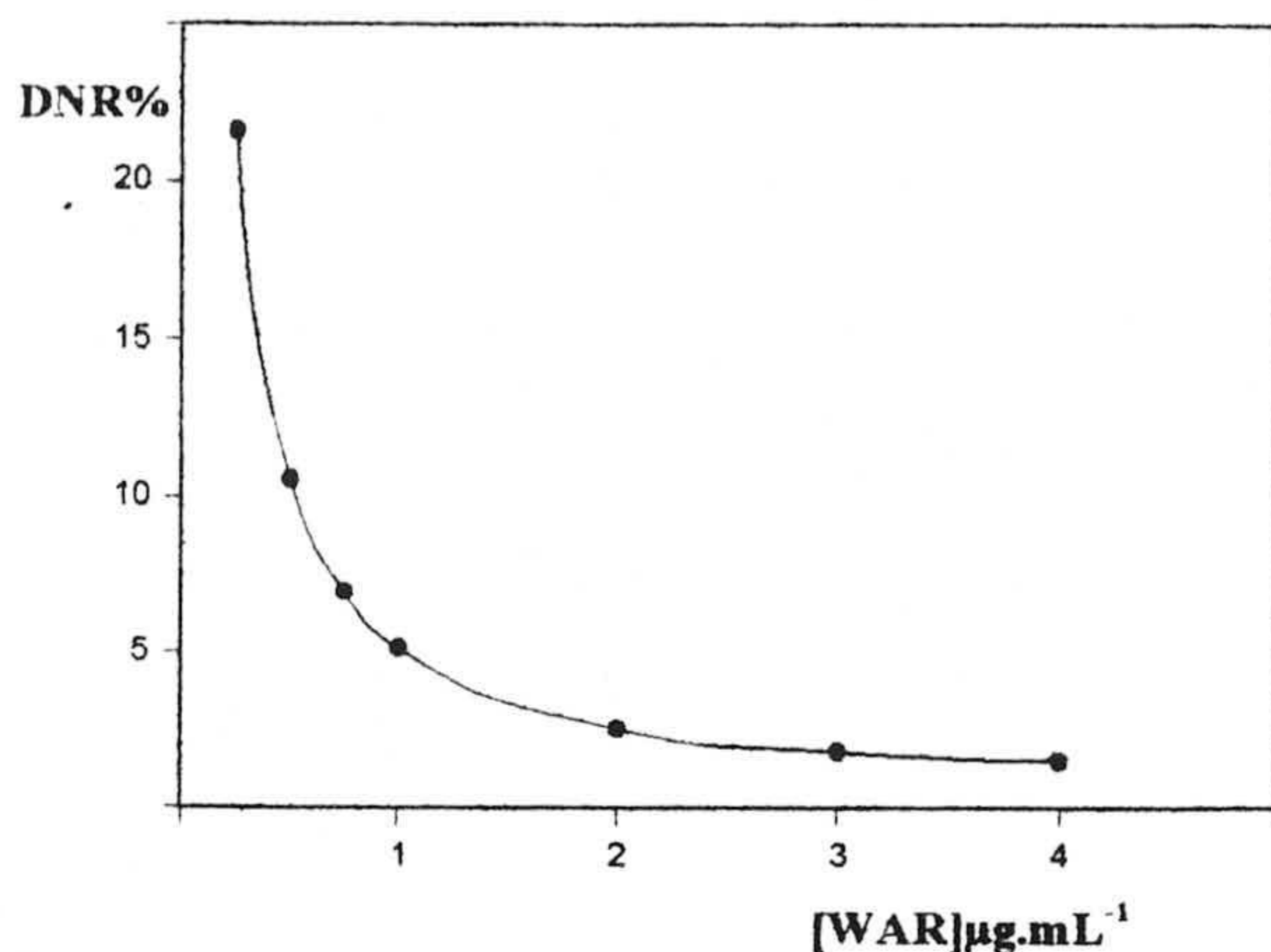


Tabla 4.20 repetibilidad del método

[WAR] µg.mL ⁻¹	S _c	DNR %
0,25	0,0540	21,60
0,50	0,0529	10,58
0,75	0,0520	6,93
1,00	0,0513	5,13
2,00	0,0508	2,54
3,00	0,0538	1,79
4,00	0,0596	1,50

Figura 4.12. Desviación estándar relativa vs concentración de WAR

De la figura 4.12 observa, como era de esperar, que a medida que aumenta la concentración de WAR analizada, la desviación estándar relativa se hace menor, ya que dividimos un valor prácticamente constante de desviación estándar a un valor de concentración cada vez será mayor.

Tabla 4.21. Resumen de los parámetros analíticos

Parámetros	Valor
RDL	2,33
Linealidad(%)	97,14
S _{cal} (µg/mL) ⁻¹	69,85
S _{anal} (µg/mL)	0,082
LD µg.mL ⁻¹	0,052
LQ µg.mL ⁻¹	0,172
r ²	99,65
Fallo de ajuste, P%	35,22

4.6. ESTUDIO DE LAS INTERFERENCIAS.

A continuación se llevó a cabo el estudio de las interferencias que pueden causar la presencia de los iones extraños más frecuentes en aguas y pesticidas tanto fosforescentes como no fosforescentes, en la determinación de WAR.

Para ello se preparó una serie de matraces aforados de 25 mL de capacidad para cada especie ensayada, conteniendo en todos los casos $2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de WAR y concentraciones crecientes de cada especie extraña. Efectuadas las medidas de

Tabla 4.22. Tolerancia a las sustancias extrañas.

Iónes y especies extrañas	Tolerancia ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
Diclone, Captan, Lindano Folpet, Paraquat, Dicuat. y Benomilo, Terbutrin, Ácido húmico.	no interfiere a concentración menor que su solubilidad en agua.
Carbaril	< 1,5
1-Naftol	< 5,5
1-Fenilfenol	< 6,3
Tiabendazol	< 0,5
Carbendazima	< 15,0
Li^+ , Na^+ , K^+ y NH_4^+	no interfiere
F^- , Cl^- , Br^- y NO_3^-	no interfiere
SO_4^{-2} y PO_4^{-3}	no interfiere
Cu^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} y Ca^{+2}	no interfiere
Al^{+3} y Be^{+2}	no interfiere
Fe^{+3}	no interfiere

fosforescencia y utilizando la recta de calibrado, se determinó en cada caso el error relativo que origina la presencia de la especie interferente. Hemos admitido como límite de tolerancia para la especie interferente, la concentración de esta que origina un error relativo del 5 %. Los resultados obtenidos están resumidos en la tabla 4.22. Como vemos en esta tabla son pocas las especies que interfieren en la determinación de WAR, siendo la más destacable de ellas las que producen el fungicida tiabendazol y el insecticida carbaril.

4.7. APLICACIONES ANALÍTICAS

Para la aplicación del método propuesto al análisis de muestras reales en las que puede encontrarse este compuesto, se eligieron como ejemplo aguas de diversas procedencia, dado que pueden contener WAR como consecuencia de la utilización de esta en campañas de desratización, y suero sanguíneo en el que se puede encontrar como consecuencia de su administración como fármaco preventivo del infarto de miocardio.

4.7.1. Determinación de WAR en aguas

Hemos elegido como casos representativos agua potable de la ciudad de Granada, agua del Río Genil, agua del Mar Mediterráneo (puerto de la ciudad de Motril) y aguas minerales de Fontdor, Lanjarón y Font Vella ya que son ejemplos de aguas potabilizadas, aguas naturales y aguas minerales. No se detectó la presencia de WAR en ningún caso, o la cantidad presente era inferior al límite detectable por el método propuesto. Por ello, se efectuó un estudio de recuperación utilizando la recta de calibrado y un método de fluorescencia en disolución [1] como método de referencia para contrastar los resultados obtenidos.

4.7.1.1. Aguas minerales, del río Genil y potable.

El procedimiento general para el análisis de todos los tipos fue el siguiente: En tres matraces de 25mL, se prepararon tres disoluciones de WAR, de concentración: 0,5; 2,0; y 4,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, enrasando hasta el volumen final con etanol y el agua problema (10 % v/v). A continuación se prepararon las correspondientes muestras, según el procedimiento descrito anteriormente, y se efectuaron las medidas de fosforescencia en las condiciones habituales. En todos los casos se obtuvieron y

midieron tres réplicas para cada tipo de muestra. Los valores de intensidad de fluorescencia transmitida a temperatura ambiente se trasladaron a la recta de calibrado obtenida anteriormente y se evaluó la concentración de analito recuperado de la correspondiente muestra. Los resultados obtenidos se resumen en las tablas 4.23, donde se observa unos valores de recuperación aceptable.

Tabla 4.23. Recuperación de warfarina en aguas minerales.

Agua	[WAR] _p	[WAR] _e (m)	%R(m)	S _{n-1}	DNR%
Lanjarón	1,0	1,001	100,1	0,0378	3,8
	2,0	1,982	99,2	0,0651	3,3
	4,0	3,988	99,7	0,1206	3,0
Font Vella	1,0	0,993	99,3	0,0416	4,2
	2,0	1,98	99,0	0,0361	1,8
	4,0	3,95	98,8	0,1222	3,1
Fontdor	1,0	1,007	100,7	0,0577	2,5
	2,0	1,996	99,8	0,0210	2,0
	4,0	3,99	99,8	0,1026	2,6
Río Genil	1,0	1,007	100,7	0,0306	3,0
	2,0	1,004	100,2	0,0569	2,8
	4,0	393,6	98,4	0,1002	2,5
Potable	1,0	0,973	97,3	0,0306	3,1
	2,0	1,980	99,0	0,0351	2,8
	4,0	3,980	99,5	0,0874	2,3

m: Media.

[WAR]_p: Puesto en $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

WAR]_e: Encontrado en $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

R: Recuperación

DNR%: Desviación normal relativa

4.7.1.2. Aplicación a agua de mar

Estudio de recuperación en agua de mar.

Tras filtrar el agua de mar a través una membrana Millipore de $0,45\ \mu\text{m}$, en una serie de matraces de 25mL se colocaron las cantidades de disolución de WAR de $100,0\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ necesarias para obtener unas concentraciones finales de 0,5; 2,0 y $3,0\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; después se añadió la cantidad de etanol necesario en cada caso para mantener la proporción del 10% de etanol y se enrasaron los matraces con agua de mar. Las disoluciones se agitaron durante 1 minuto y, a continuación, se aplicó el

procedimiento operatorio establecido para preparar las respectivas réplicas de las muestras y proceder a su medida. Los resultados obtenidos de las señales de fosforescencia transmitida se recogen en la tabla 4.24, observándose una buena recuperación.

Tabla 4.24. Recuperación de WAR en agua del Mar Mediterráneo (Puerto de la ciudad de Motril).

[WAR] _p	[WAR] _e	%R(m)	S _{n-1}	DNR%
1,0	0,973	97,3	0,0306	3,1
2,0	1,95	97,6	0,0503	2,6
4,0	3,93	98,2	0,0945	2,4

Los valores presentados en esta tabla son resultados de tres replicas de cada muestra.

4.7.2. Determinación de warfarina en suero sanguíneo

Una de las aplicaciones más importante en el análisis de la warfarina es su determinación en suero sanguíneo. Para ello y puesto que el método directamente no detecta su presencia en las muestras estudiadas, se preparó la muestra de suero problema de la siguiente forma: en un matraz aforado de 10 mL de volumen, se puso una cantidad conocida (0,4 mL) de disolución patrón de WAR de 100,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y 2,5 mL de etanol. A continuación se añadió suero sanguíneo hasta el enrase agitándose la mezcla durante 2 min.

Tras aplicar este procedimiento operatorio establecido para la preparación de la muestra, se observó que la señal fosforescente de la WAR había desaparecido totalmente

4.7.2.1. Influencia de la cantidad de suero sanguíneo

A la vista de los resultados obtenidos en la anterior experiencia se pensó que la ausencia de señal fosforescente puede deberse a interferencias producidas

por la matriz de la muestra. Para comprobar esta hipótesis se procedió como sigue: se prepararon una serie de matraces aforados de 10 mL en los cuales se introdujeron cantidades conocidas de disolución patrón de WAR de $100 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ de concentración, volúmenes crecientes (0, 1, 2, 4, 6, 8, y 10 mL) de suero sanguíneo y etanol y agua destilada en las proporciones adecuada para mantener un porcentaje total de etanol del 10%v/v. Estas disoluciones se agitaron mediante un baño de ultrasonidos durante 2 minutos.

Similarmente se prepararon los blancos adecuados de cada muestra para calcular la intensidad fosforescente relativa de cada disolución.

Los resultados obtenidos de tres réplicas independientes en cada una de las disoluciones se resumen en la tabla 4.25 y se representan en la figura 4.12

Figura 4.12. Influencia de la cantidad de suero sanguíneo

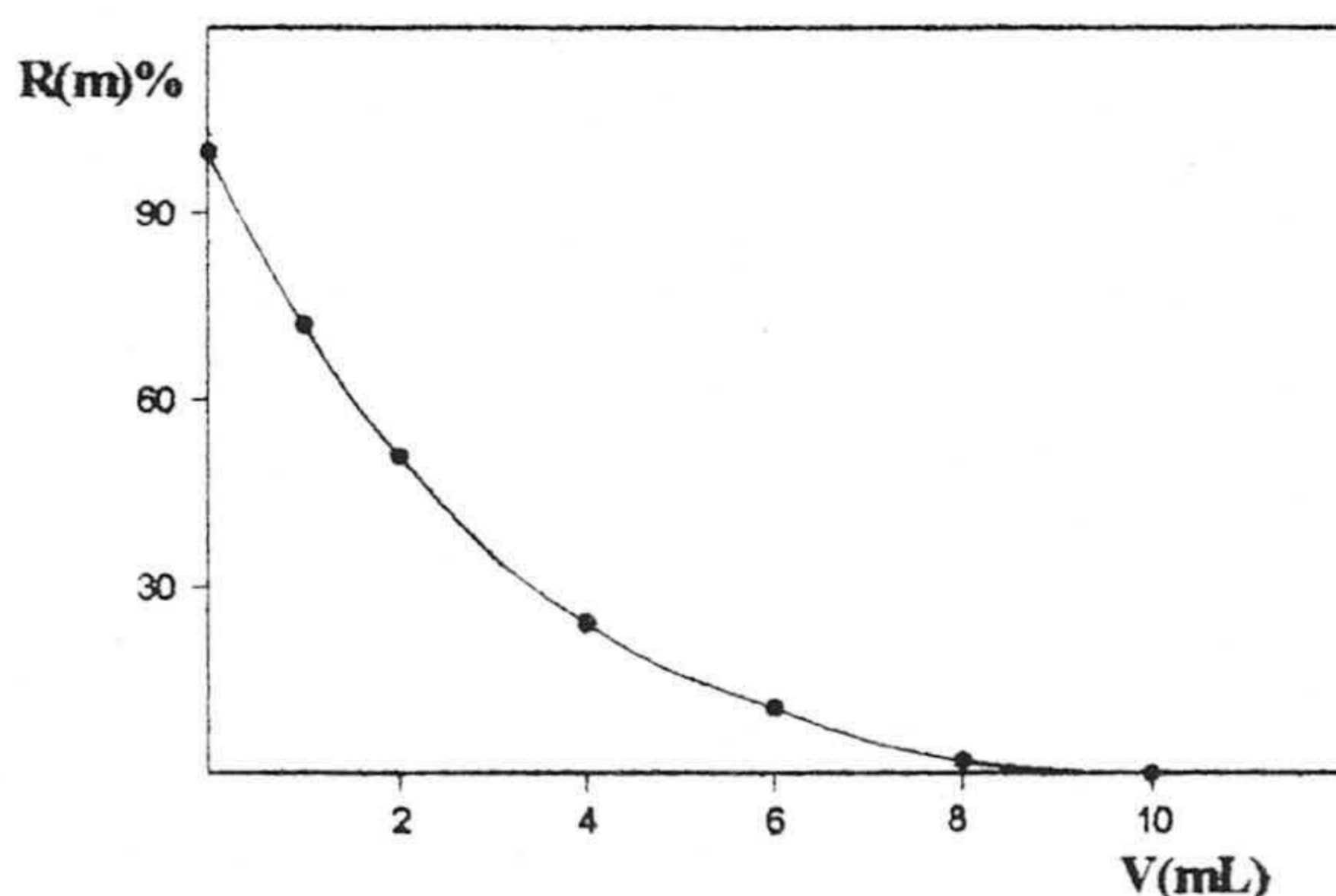


Tabla: 4.25.

V(mL)	R(m)%
0	99,8
1	72,5
2	51,3
4	24,1
6	10,5
8	2,2
10	1,0

De los resultados representados en la figura 5.12 se deduce que el suero contiene uno o más componentes que impiden la emisión de fosforescencia. Probablemente este sea la albúmina y para comprobar su interferencia se realizó la siguiente experiencia. En cuatro matraces aforados de 25 mL conteniendo $4 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ de WAR en cada uno de ellos, se añadieron cantidades crecientes (0,0; 0,25; 0,50;

y 1,0) g de albúmina disuelta en NaOH. En un quinto matraz se colocaron $4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de WAR en agua destilada y 4 mL de suero sanguíneo. A continuación se estudió la recuperación de WAR en cada muestra mediante la recta de calibrado con patrones. Los resultados obtenidos de esta experiencia se resumen en la tabla 4.26.

Tabla 4.26. Recuperación de warfarina

muestra	Cantidad de albúmina (g)	%R(m)	%DNR
1	0,00	99,7	2,3
2	0,25	56,7	3,7
3	0,50	29,6	4,2
4	1,00	25,4	4,3
5	suero (4mL)	26,7	3,7

De los resultados obtenidos mediante la anterior experiencia se concluye que la existencia de albúmina elimina o disminuye muy sensiblemente la señal fosforescente de WAR, razón por la que hay que proceder a su eliminación antes de efectuar el correspondiente análisis

4.7.2.2. Eliminación de la albúmina del suero.

Antes de proceder al análisis de muestras del suero sanguíneo, se procedió en primer lugar a la eliminación de la albúmina mediante precipitación.

4.7.2.3. Elección del agente precipitante

Para precipitar la albúmina se ensayaron disoluciones saturadas de dos sales, sulfato de sodio (Na_2SO_4) y sulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$); comprobándose que esta última produce una mejor precipitación por lo cual se procedió a optimizar las condiciones experimentales en las que se produce dicha separación.

4.7.2.4. Influencia de la concentración de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Para optimizar la concentración más adecuada para precipitar y eliminar la albúmina del suero, se prepararon una serie de siete matraces aforados donde se introdujeron en cada uno ellos una cantidad conocida de suero sanguíneo, otra cantidad conocida de disolución patrón de WAR para obtener una concentración final de $4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ y se agitaron durante 2 min y, por último, se añadieron 5 mL de disolución de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de diferente concentración. Tras agitar de nuevo el contenido de las matraces, se filtraron a través de papel de filtro. Paralelamente se prepararon los respectivos blancos.

Aplicando el procedimiento operatorio propuesto, se midieron las intensidades de fosforescencia transmitida. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 4.27 y se representan en la figura 4.13

Figura 4.13. Influencia de la concentración de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sobre la IFR de la warfarina.

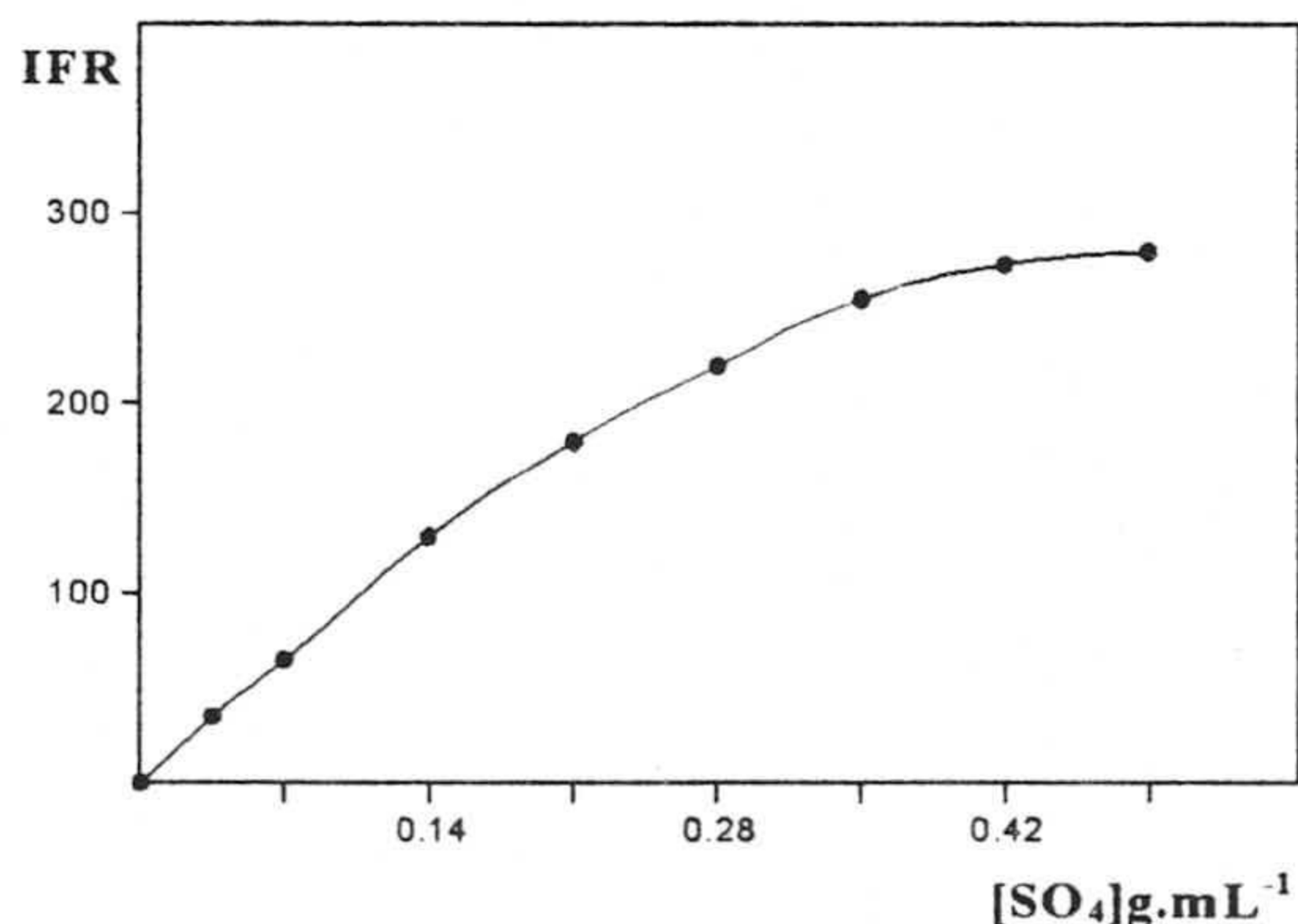


Tabla 4.27.

$[\text{SO}_4^{2-}] \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$	IFR
0,00	4,3
0,03	40,5
0,07	75,5
0,14	130,4
0,21	165,3
0,28	210,5
0,35	260,6
0,42	270,7
0,49	279,5

De la observación de los resultados representados en la anterior figura se deduce que la intensidad de fosforescencia relativa aumenta al incrementar de la concentración de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ hasta que esta alcanza un valor de $0,42 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ a partir del cual se mantiene prácticamente constante. Este resultado nos permite con-

cluir que la concentración mínima necesaria de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para eliminar la interferencia de albúmina en el suero sanguíneo es de $0,42 \text{ g.mL}^{-1}$

4.7.2.5. Influencia de volumen de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Fijada la concentración de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, en $0,42 \text{ g.mL}^{-1}$ el siguiente paso es comprobar el volumen mínimo de dicha disolución necesario para producir la respuesta óptima. Para ello se prepararon una serie de matraces cada uno de ellos con 5 mL de suero sanguíneo, cantidad conocida de patrón de WAR de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de modo que la concentración final fue de $4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ y volumen creciente (1, 2, 3, 4, 5, y 6 mL) de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de concentración $0,42 \text{ g.mL}^{-1}$ enrasando con etanol agua como en experiencias anteriores. A continuación se agitó la mezcla unos dos minutos, se centrifugó y se filtró a través papel de filtro. Siguiendo el mismo procedimiento se prepararon blancos de cada una de las disoluciones.

Figura 4.14. Influencia del volumen de disolución de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sobre la IFR.

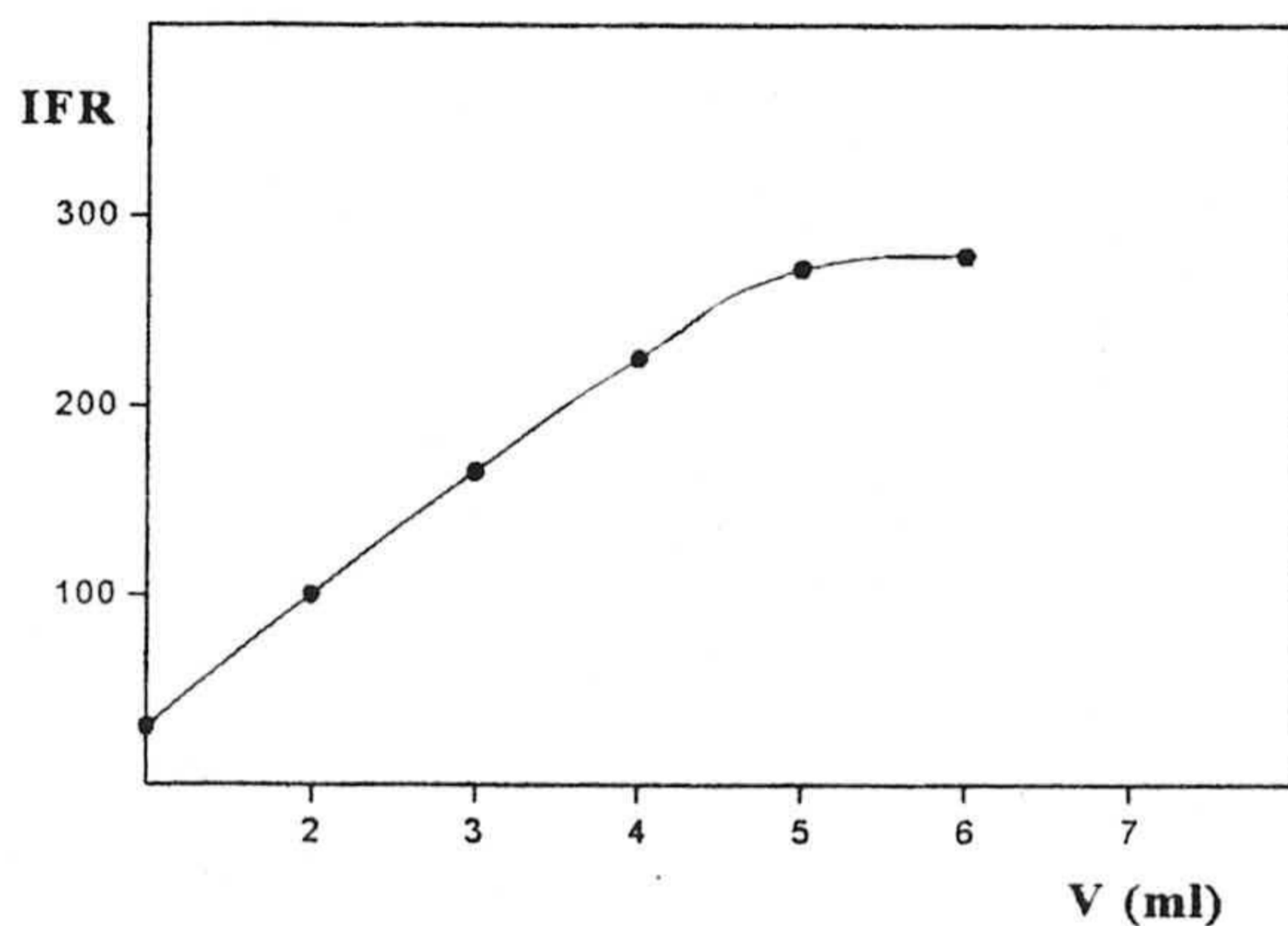


Tabla 4.28.

V(mL)	IFR
1	30
2	100
3	165
4	128
5	172
6	179

Mediante el mismo procedimiento operatorio se prepararon las correspondientes muestras y blancos y se registraron los espectros de fosforescencia. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 4.28 y se representan en la figura 4.14.

De la anterior experiencia podemos concluir que el volumen mínimo de disolución de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ necesario para eliminar la albúmina del suero es de 5 mL valor este que adoptaremos en próximas experiencias.

4.7.2.6. Calibrado con adición de patrón para suero sanguíneo

Siguiendo el adecuado tratamiento mencionado anteriormente para eliminar la albúmina de la muestra de suero sanguíneo y con objetivo de validar el método propuesto, hemos seguido también la estrategia del calibrado de adición de patrón explicado anteriormente en el capítulo 1. Para ello operaremos sobre dos muestra de suero sanguíneo con concentraciones distintas ($1,0$ y $2,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$) de WAR.

El método se realizó por triplicado para la obtención de la curva de calibrado AC y AC1.

Tabla 4.29. Adición de patrón [WAR] $1\mu\text{g.mL}^{-1}$

[WAR] añadido	IFR (3 réplicas)		
0,00	73,5	66,3	78,9
1,00	137,8	145,2	150,2
2,00	212,3	206,5	220,4
3,00	273,2	276,2	280,3

Tabla 4.30. Adición de patrón [WAR] $2\mu\text{g.mL}^{-1}$.

[WAR] añadido	IFR (3 réplicas)		
0,00	138,7	144,4	149,9
0,50	178,9	175,2	167,9
1,00	205,7	210,7	216,5
2,00	271,3	275,2	280,9

Calibrado de Youden

Realizado el calibrado de Youden, explicado anteriormente en el capítulo 1, sobre cantidades crecientes de muestra problema tratada para eliminar la albúmina del suero sanguíneo.

Tras aplicar el procedimiento operatorio propuesto para preparar la muestra de medida, se obtuvieron las intensidades de fosforescencia relativa que se recogen en la tabla 4.31, y se representan en figura 4.15.

Figura 4.15. Calibrado de Youden YC para suero sanguíneo.

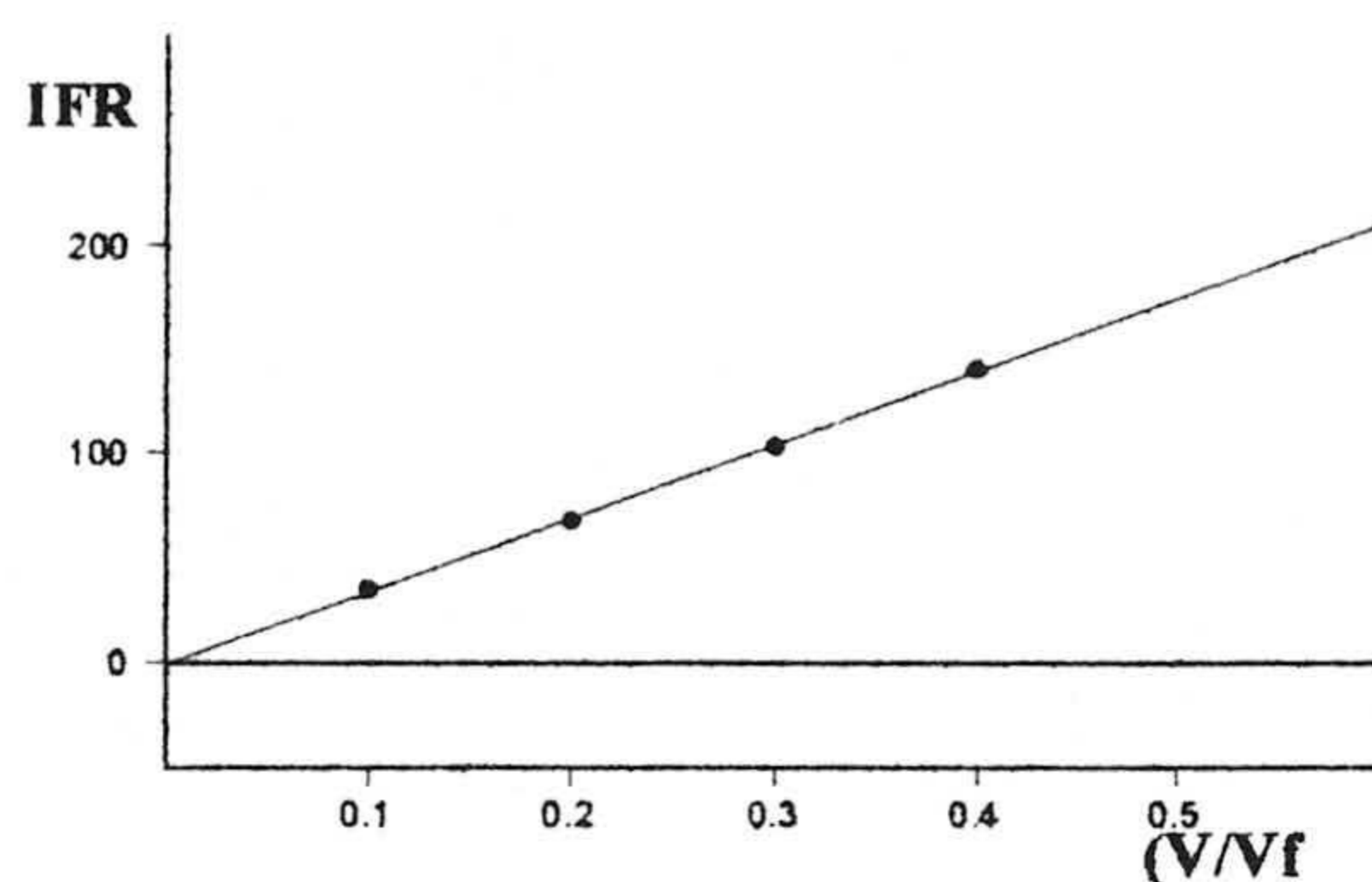


Tabla 4.31.

V/V _f	IFR
0,10	19,12
0,20	35,7
0,30	53,9
0,40	67,8

Los parámetros estadísticos correspondientes a las ecuaciones de las rectas de calibrado, SC, AC, AC₁ y YC se resumen en la tabla 4.32.

Tabla 4.32. Valores numéricos de los parámetros correspondientes a las rectas SC, AC, AC₁ y YC. Suero sanguíneo.

Parámetros	SC	AC	AC ₁	YC
n	21	12	12	4
m	3	3	3	1
a	0,524	74,78	143,23	3,07
b	69,76	67,97	66,33	164,24
S _{x,y}	5,823	5,74	5,072	1,332
r	0,998	0,998	0,996	0,999
P _{x,y}	35,22	52,65	64,38	

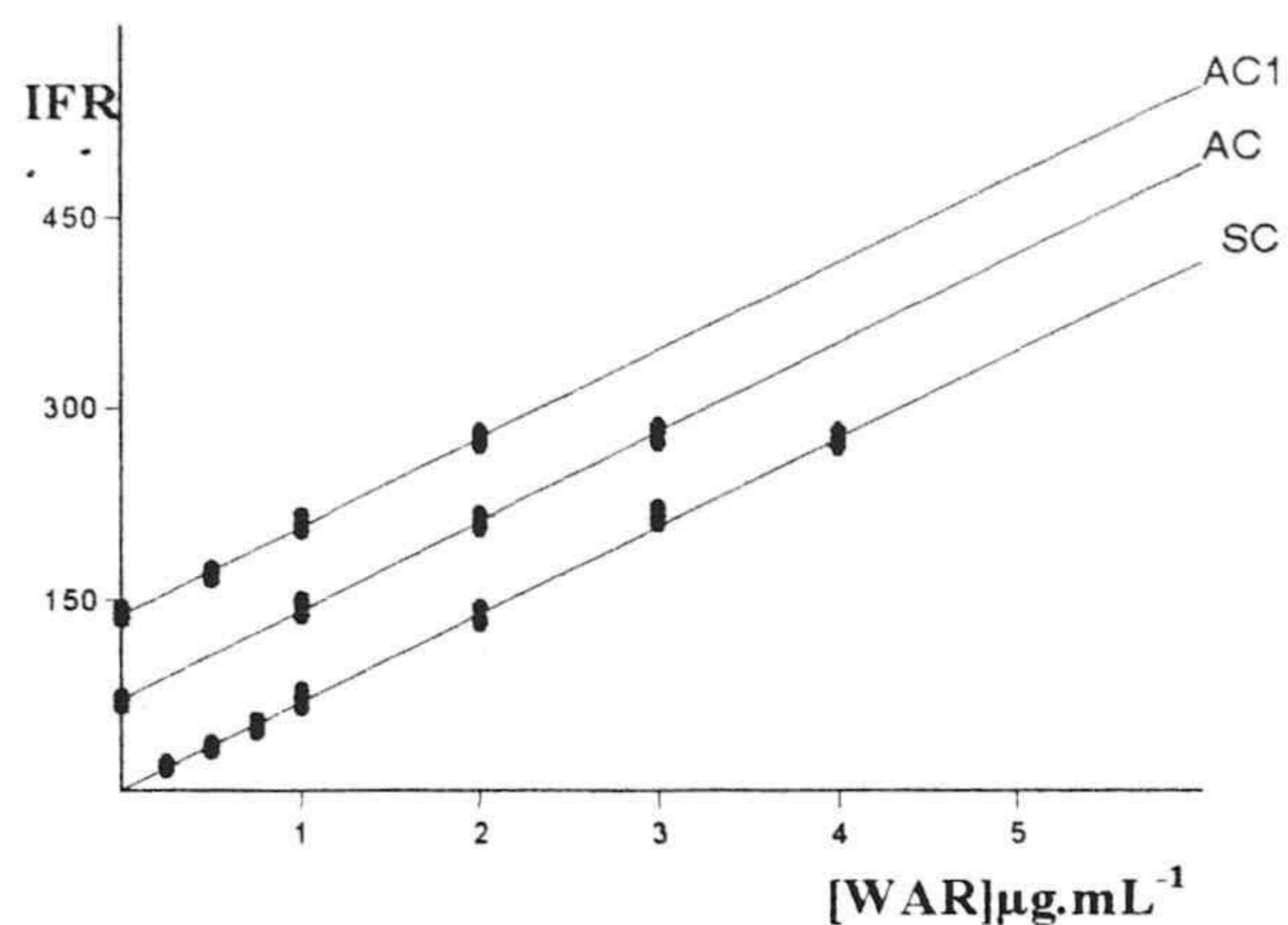


Figura 5.16. (a) Calibrado con patrones SC, (b) Calibrado con adición de patrón AC y (c) Calibrado con adición de patrón AC1.

De los resultados obtenidos se observa que hay buen ajuste del modelo de regresión lineal para los cuatro calibrados ya que $P > 5\%$ para SC, AC, AC₁ y YC a un nivel de confianza de 95 %.

A partir de estos datos se aplica el procedimiento estadístico para llevar acabo la validación del método analítico en la determinación del analito en suero sanguíneo.

Resultados del criterio de validación por adición de patrón

Comparación de pendientes.

Los resultados de test de comprobación de las pendientes se resumen en la tabla 4.33.

Tabla 4.33. Resultados de la comparación de los calibrados SC, AC y AC1.

Parámetros	Valores
S_p	5,79
$S_p(1)$	5.58
$t(b)$	1,01
$t(b)_1$	1,45
b_p	69,2
$b_p(1)$	69.2
BY	1,68
BY(1)	1,67

Se comprobó que los valores del estadístico t de Student $t(b)$ son menores que el valor t tabulado a un nivel de confianza del 95% para $(n_{SC} + n_{AC} - 4)$ grados de libertad, por tanto no hay diferencia significativa entre ambas pendientes.

Calculo de la ordenada en el origen. Blanco de Youden.

Se pudieron calcular los nuevos valores de \hat{a} , \hat{a}_A y \hat{a}_S las ordenadas en el origen para los calibrados AC, AC₁, y SC respectivamente y el intervalo de confianza del calibrado con patrones, mediante la utilización de los valores de pendiente promedio b_p , desviación estándar promedio S_p y t de Student con $(n_s - 2)$ grados de libertad para un nivel de confianza del 95%. Los resultados obtenidos se recogen en la tabla 4.34.

Tabla 4.34. Nuevas ordenadas en el origen, y intervalo de confianza sobre a_s .

Parámetros	SC	AC
a'	1,393	72,88
Intervalo de confianza sobre a_s	[-2,85, 5,63]	
a_Y	3,07	
Parámetros	SC	AC1
a'	1,394	140,70
Intervalo de confianza sobre a_s	[-2,69, 5,48]	
a_Y	3,07	

A vista de los resultados obtenidas en la tabla 4.34, se comprobó que el blanco de Youden del suero sanguíneo está incluido en su correspondiente intervalo de confianza.

Comprobación de la exactitud.

Se llevó a cabo comparando el contenido en la muestra utilizando directamente la recta de calibrado con patrones y mediante el calibrado con adición de patrones. Esta comparación se realizó mediante el cálculo del estadístico $t(c)$. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 4.35.

Tabla 4.35. Comparación de la exactitud.

Parámetros	SC	AC
$C_{X,S}$	1,017
$C_{X,A}$	1,008
$t(c)$	0,2782 (P =78,28 %)	
El valor crítico de t tablado igual a 2,042 (P = 5%).		
Parámetros	SC	AC1
$C_{X,S}$	1,963
$C_{X,A}$	1,989
$t(c)$	0,8752(P =38,84 %)	
El valor crítico de t tablado igual a 2,042 (P = 5%).		

A partir de los resultados obtenidos en la tabla anterior se observó que no existe discrepancia entre los resultados. Mediante la comparación se pudo concluir que no hay diferencia significativa ente los contenidos calculados. Ya que $t(c)_{cal} < t(c)_{tab}$ para $(n_{SC} + n_{AC} - 3)$ grado de libertad, se acepta que el método es exacto con un valor P mayor del 5% a un nivel de confianza del 95%.

4.8. VALIDACIÓN DEL MÉTODO PROPUESTO MEDIANTE COMPARACIÓN CON UN MÉTODO ESPECTROFLUORIMETRICO.

Otra vía usada para comprobar de la exactitud y la validez (aplicabilidad) de los resultados obtenidos mediante el método propuesto, fue comparar estos resultados con los resultados conseguidos mediante el método espectrofluorimétrico

propuesto por Márquez, Hernández, y Sánchez [1], que tomamos como método de referencia.

4.8.1. Comparación de los resultados obtenidos mediante ambos métodos para muestras reales.

En las siguientes tablas se resumen los resultados obtenidos mediante nuestro método y los obtenidos mediante el método de referencia. Procedimos a la comparación de los resultados obtenidos sobre las mismas muestras reales antes descritas, la comparación se hizo aplicando el método estadístico descrito en el capítulo 1 de la presente Memoria.

Tabla 4.36. Recuperación de warfarina en distintos tipos de agua.

Muestra(agua)	[WAR] _p	[WAR] _{e,a}	[WAR] _{e,b}	P%
Potable de Granada	1	1,09	1,08	76,3
	2	2,02	2,05	42,8
	4	4,06	4,02	26,1
Lanjarón	1	1,00	1,01	82,2
	2	2,06	2,02	94,2
	4	4,04	4,03	95,5
Fontdor	1	0,99	1,00	54,3
	2	1,93	2,00	62,1
	4	3,96	4,01	41,3
Font Vella	1	1,02	0,99	23,8
	2	1,96	2,01	21,3
	4	4,03	4,01	20,8
Río Genil	1	1,01	1,01	85,5
	2	2,02	2,01	82,3
	4	3,91	3,99	26,9
Mar Mediterráneo	1	0,93	1,01	26,8
	2	2,08	2,04	21,2
	4	4,04	4,00	20,5

[WAR]_{pe}: puesto $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Valores medio de tres replicas

[WAR]_{e,a}: Encontrado por nuestro método, $\mu\text{g.mL}^{-1}$

[WAR]_{e,b}: Encontrado por el método de referencia, $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Los resultados obtenidos de la comparación estadística del contenido en el pesticida en las muestras reales de agua (mineral, potable de la ciudad de Granada, del río Genil, del mar Mediterráneo) y plasma humano (suero sanguíneo), junto con los parámetros estadísticos necesarios para tal fin, se resumen en las siguientes tablas.

4.8.2. Suero sanguíneo.

Se utilizaron tres muestras distintas de plasma humana con concentraciones diferentes (1,0; 2,0 y 4 µg.mL⁻¹).

Tabla 4.37. Recuperación de warfarina en el suero sanguíneo.

Muestra	[WAR] _p	[WAR] _{e,a}	[WAR] _{e,b}	P%
N° .1	1	1,00	1,01	82,1
	2	1,94	2,01	40,2
	4	3,98	4,00	38,7
N° .2	1	0,96	0,99	60,5
	2	2,06	2,07	62,8
	4	4,01	3,98	48,3
N° .3	1	0,95	0,94	30,4
	2	1,89	1,90	32,8
	4	4,10	3,98	40,1

[WAR]_p: cantidades puestas en la muestra, µg.mL⁻¹.

e: Valores medio de tres replicas

[WAR]_{e,a}: Encontrado por nuestro método, µg.mL⁻¹

[WAR]_{e,b}: Encontrado por el método de referencia, µg.mL⁻¹

Como vemos de la comparación de los resultados obtenidos anteriormente mediante nuestro método y el método de referencia explicado en el capítulo 1 comprobamos que los valores del estadístico test de student t_{cal} es menor que el valor t_{tab} a un nivel de confianza del 95% para $(n_{Ref} + n_r - 2)$ grados de libertad, por tanto no hay diferencias significativas entre las medias de ambos conjuntos de datos de los dos métodos por lo que el método aplicado es exacto.

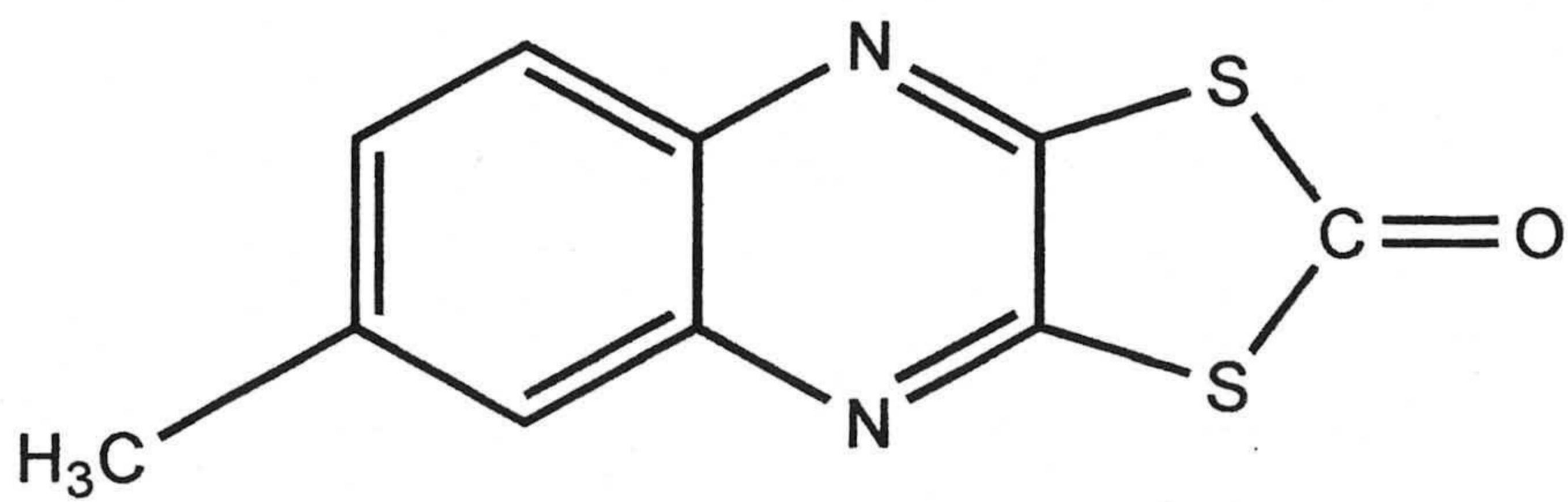
Podemos concluir que el método propuesto para la determinación de warfarina en aguas y suero sanguíneo mediante fosforescencia a temperatura ambiente

sobre papel da resultados exactos y precisos, siendo además simple en su realización que era uno de los objetivos buscando en esta Memoria.

Como resultado de los estudios realizados se ha publicado un artículo denominado: Determination of Warfarina in Water and Human Plasma by Solid-Phase Room - Temperature Transmitted Phosphorescence por L. F. Capitán-Vallvey, M. K. A. Deheidell, and R. Avidad, en la revista Archives of Environmental Contamination Toxicology, 37, 1-6, (1999), del que hemos incluido una copia en el Apéndice nº 3 de esta Memoria.

Bibliografía

1. J. C Márquez, M. Hernández y F. García – Sánchez., *Analyst* 115, 1003-1005 (1990)



CAPÍTULO 5

ESTUDIO DEL MORESTAN MEDIANTE
ESPECTROFOSFORIMETRÍA EN FASE SÓLIDA

ÍNDICE DEL CAPÍTULO

5.1	CARACTERÍSTICAS FOSFORESCENTES DEL MORESTAN	265
	5.1.1 Espectros de luminiscencia total del MOR en fase sólida	265
	5.1.2 Espectros bidimensionales del MOR en fase sólida	267
5.2	OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES EXPERIMENTALES	268
	5.2.1 Optimización de variables experimentales de la muestra	269
	5.2.1.1 <i>Elección del soporte sólido.</i>	269
	5.2.1.2 <i>Selección del metal pesado</i>	270
	5.2.1.3 <i>Uso de láminas de cuarzo para medir la fosforescencia.</i>	271
	5.2.1.4 <i>Influencia del pH del medio</i>	272
	5.2.1.5 <i>Influencia de la fuerza iónica del medio</i>	273
	5.2.1.6 <i>Influencia del volumen de muestra depositado en el papel.</i>	274
	5.2.1.7 <i>Influencia del tiempo de secado.</i>	275
	5.2.2 Optimización de variables instrumentales	276
	5.2.2.1 <i>Optimización del ancho de rendijas</i>	276
	5.2.2.2 <i>Optimización de los tiempos del detector</i>	277
5.3	PROCEDIMIENTO OPERATORIO	278
5.4	ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE CONCENTRACIÓN Y SEÑAL ANALÍTICA	278
5.5	PARÁMETROS ANALÍTICOS	279
	5.5.1 Recta de calibrado	279
	5.5.2 Linealidad	281
	5.5.3 Sensibilidad	281
	5.5.4 Límites de detección y cuantificación	282
	5.5.5 Rango dinámico lineal	282
	5.5.6 Precisión	283
5.6	ESTUDIO DE INTERFERENCIAS	284
5.7	APLICACIONES ANALÍTICAS	286
	5.7.1 Determinación de MOR en aguas	282
	5.7.1.1 <i>Aguas minerales, de río y potable</i>	286
	5.7.1.2 <i>Agua de mar</i>	287
	5.7.2 Aplicación a la determinación de MOR en productos agrícolas	293
	BIBLIOGRAFÍA	296

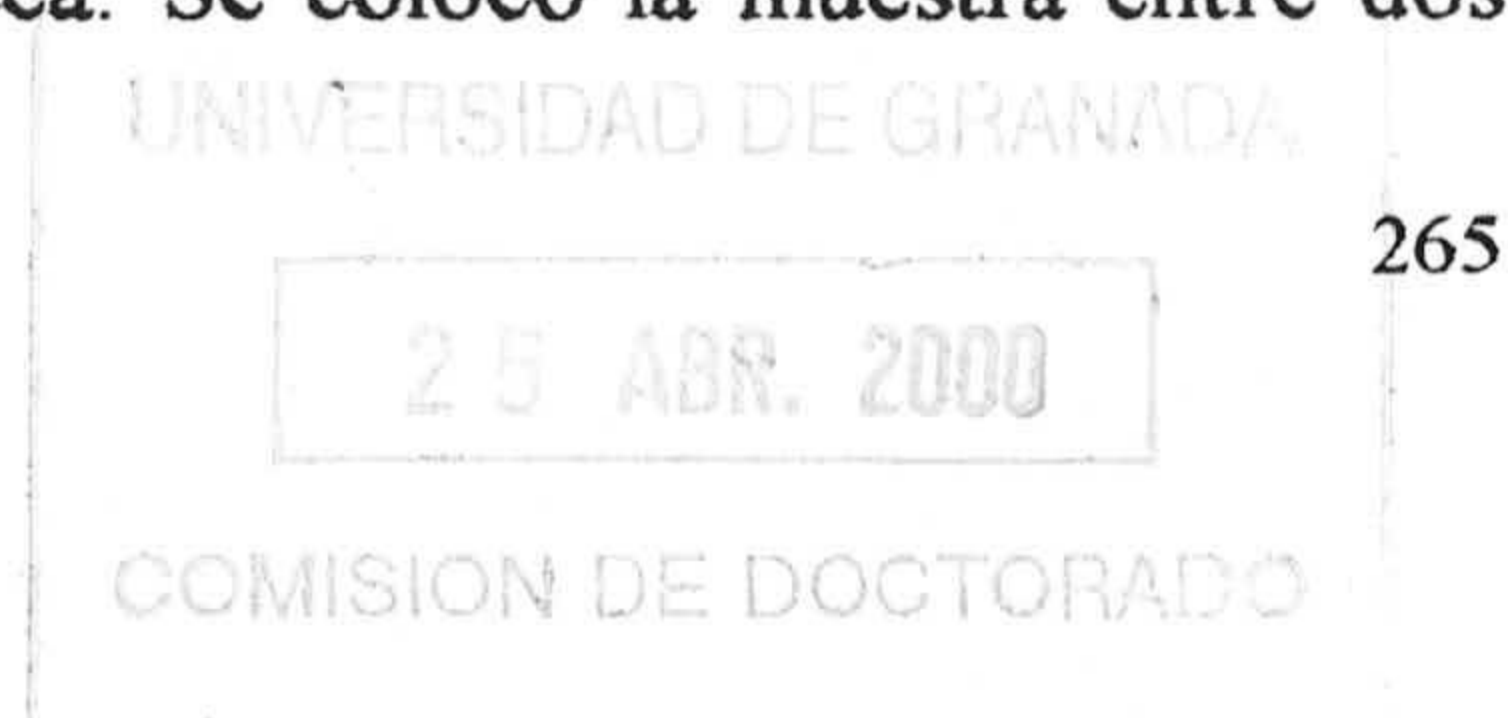
El 6-metil-2,3-quinoxalinditiolciclo S,S-ditiocarbonato comúnmente llamado quinometionato, oxtioquinox o morestan (MOR), se emplea como plaguicida por ser un poderoso fungicida con actividad preventiva y curativa frente a oidios. Así mismo ejerce un buen control secundario sobre ácaros en diversos cultivos herbáceos y leñosos y muy especialmente en los cultivos de patata, por lo que puede estar presente en aguas naturales resultantes de explotaciones agrícolas. No obstante, a pesar de su eficacia como fungicida e insecticida hay que tener presente que puede resultar fitotóxico para especies tales como: manzana, pera, rosas, aliso y otras plantas ornamentales, sin mencionar su toxicidad para el hombre o animales domésticos, razones suficientes para justificar la necesidad de disponer de métodos sensibles de análisis para MOR, que sean además aplicables a su determinación en matrices tales como aguas, patata, y verduras en general.

El morestan, según el resultado de los ensayos cualitativos realizados por nosotros y de acuerdo con la bibliografía consultada [1], muestra fosforescencia a temperatura ambiente en fase sólida usando como soporte sólido papel Whatman (W4).

5.1. CARACTERÍSTICAS FOSFORESCENTES DEL MORESTAN.

5.1.1. Espectros de luminiscencia total del MOR en fase sólida

Para conocer el espectro de fosforescencia total del MOR en fase sólida a temperatura ambiente, se utilizó papel cromatográfico Wathman nº 4 (W4) como soporte sólido. Para ello se preparó una muestra de la siguiente forma: sobre el soporte sólido se depositaron 5 μ L de disolución de MOR de 1,0 mg.L⁻¹. A continuación se secó la muestra mediante aire caliente producido por un secador de pelo de uso doméstico hasta que quedó totalmente seca. Se colocó la muestra entre dos



láminas de cuarzo de 4,5x1x0,1 cm y se registraron los espectros de fosforescencia con las siguientes condiciones instrumentales: $t_g = 0,15$ ms, $t_d = 12$ ms, intervalo de longitud de onda excitación: 350-400 nm, intervalo de longitud de onda de emisión: 450-600 nm, espaciado entre barridos: 3 nm, velocidad de barrido: 240 nm.min⁻¹, número de barridos: 30, rendija de excitación: 5 nm y rendija de emisión: 10 nm.

En la figura 5.1 se muestra el espectro obtenido, visto desde cuatro ángulos diferentes, después de eliminar la contribución del blanco. Como se puede apreciar en la citada figura 5.1, el MOR en fase sólida presenta un máximo de emisión fosforescente situado a 363 nm de longitud de onda de excitación y 527 nm de longitud de onda de emisión.

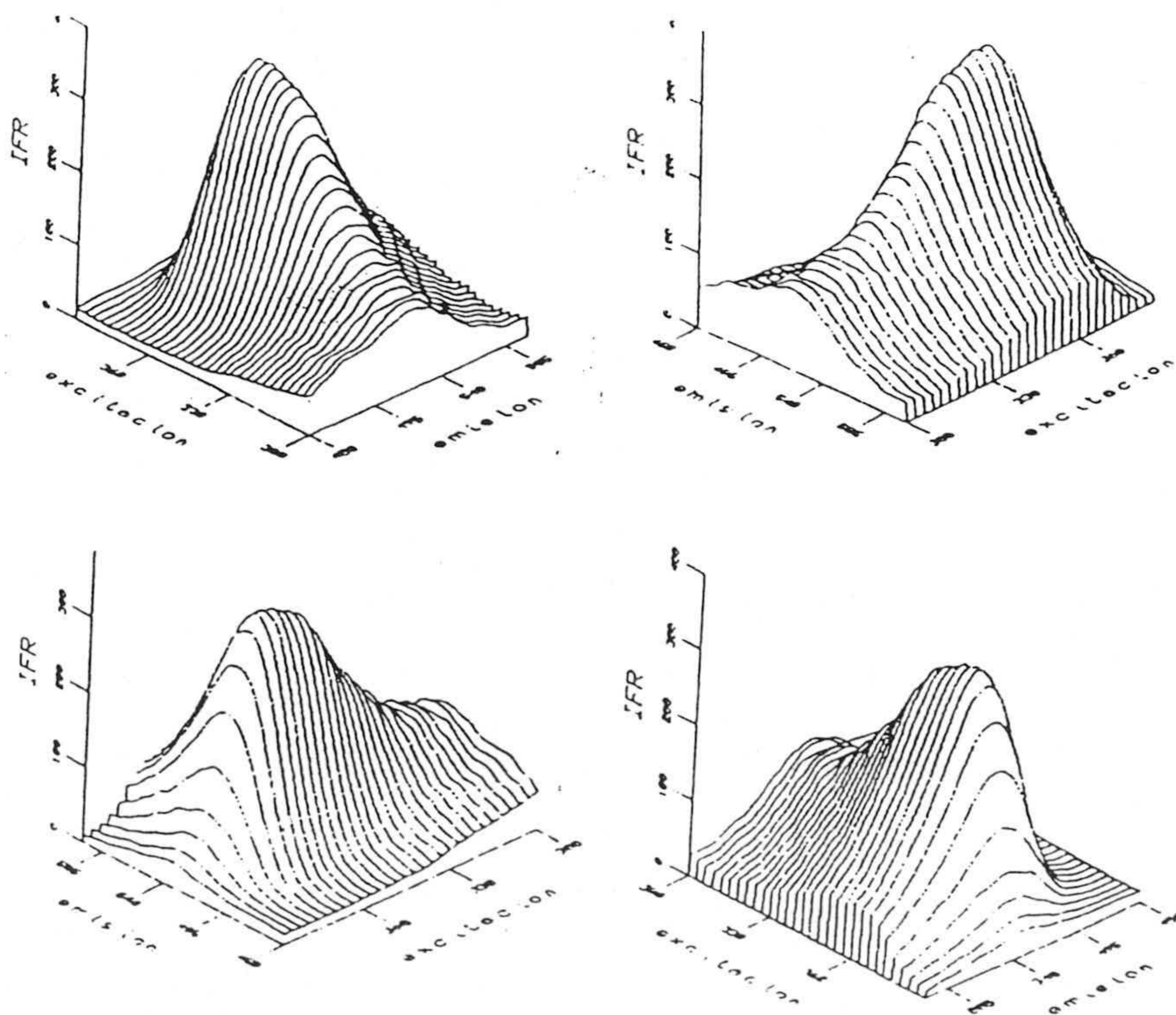


Figura.5.1. Espectros de fosforescencia total del MOR en fase sólida, desde diferentes ángulos

Mediante el programa informático Golden Surfer, anteriormente citado, estos datos del espectro tridimensional se manipularon uniendo los puntos de igual intensidad de emisión fosforescente, resultando así las curvas de nivel que podemos ver en la figura 5.2.

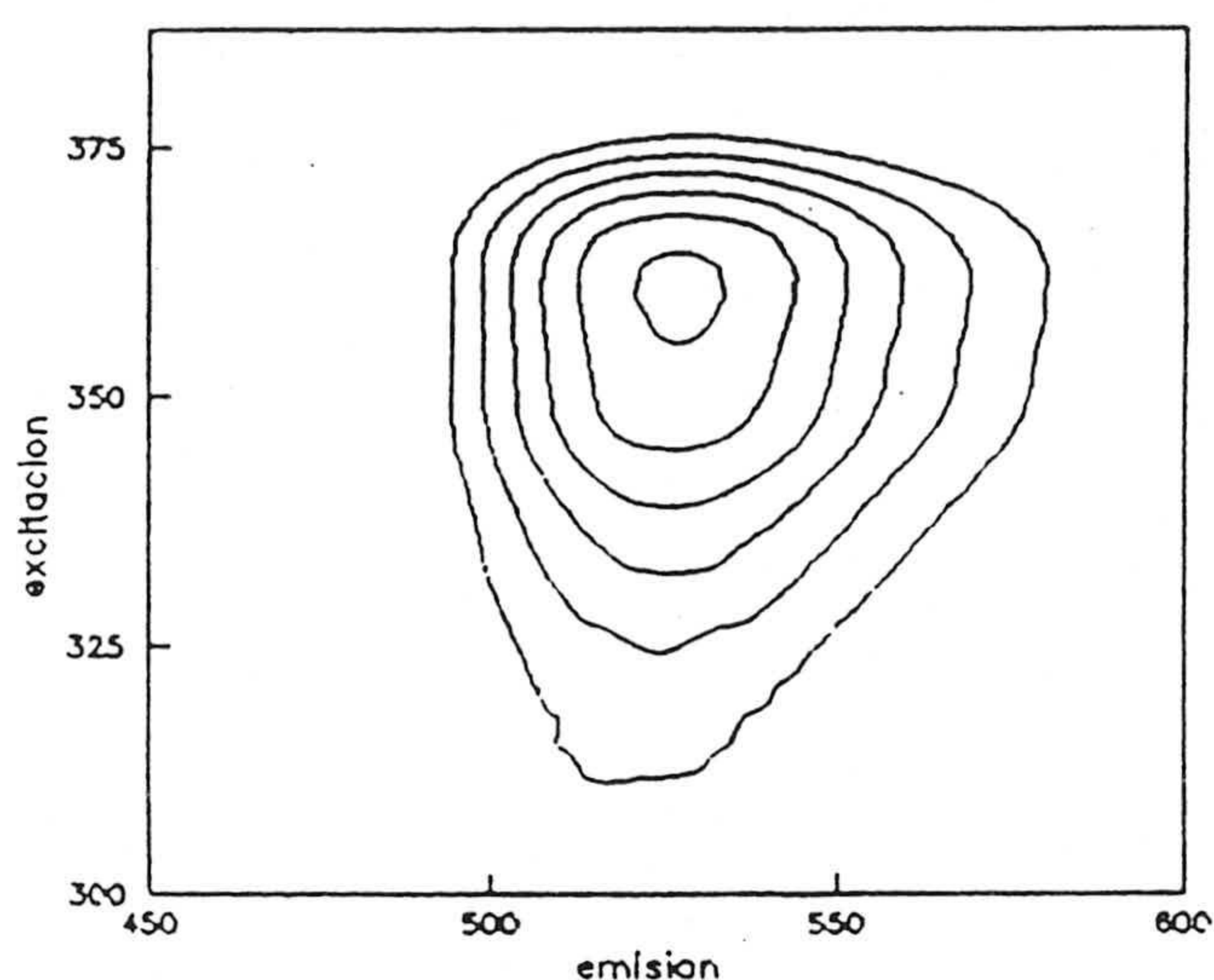


Figura 5.2. Curvas de nivel del MOR en fase sólida

5.1.2. Espectros bidimensionales del MOR en fase sólida.

Conocida la posición del máximo espectral, obtenido a partir de las curvas de nivel de la figura 5.2, se procedió a registrar los espectros bidimensionales de excitación y emisión del MOR en fase sólida para facilitar la optimización de las diferentes variables experimentales que afectan a la emisión fosforescente. Para ello, se preparó la muestra de forma similar a la descrita en el apartado anterior y se registraron los espectros como sigue: para el espectro de excitación la longitud de onda de emisión fue 527 nm, registrándose el espectro entre 350nm y 400 nm

de excitación y para el espectro de emisión, la longitud de onda de excitación fue de 363 nm registrándose el espectro entre 450 nm y 600 nm. Los espectros obtenidos los podemos observar en la figura 5.3.

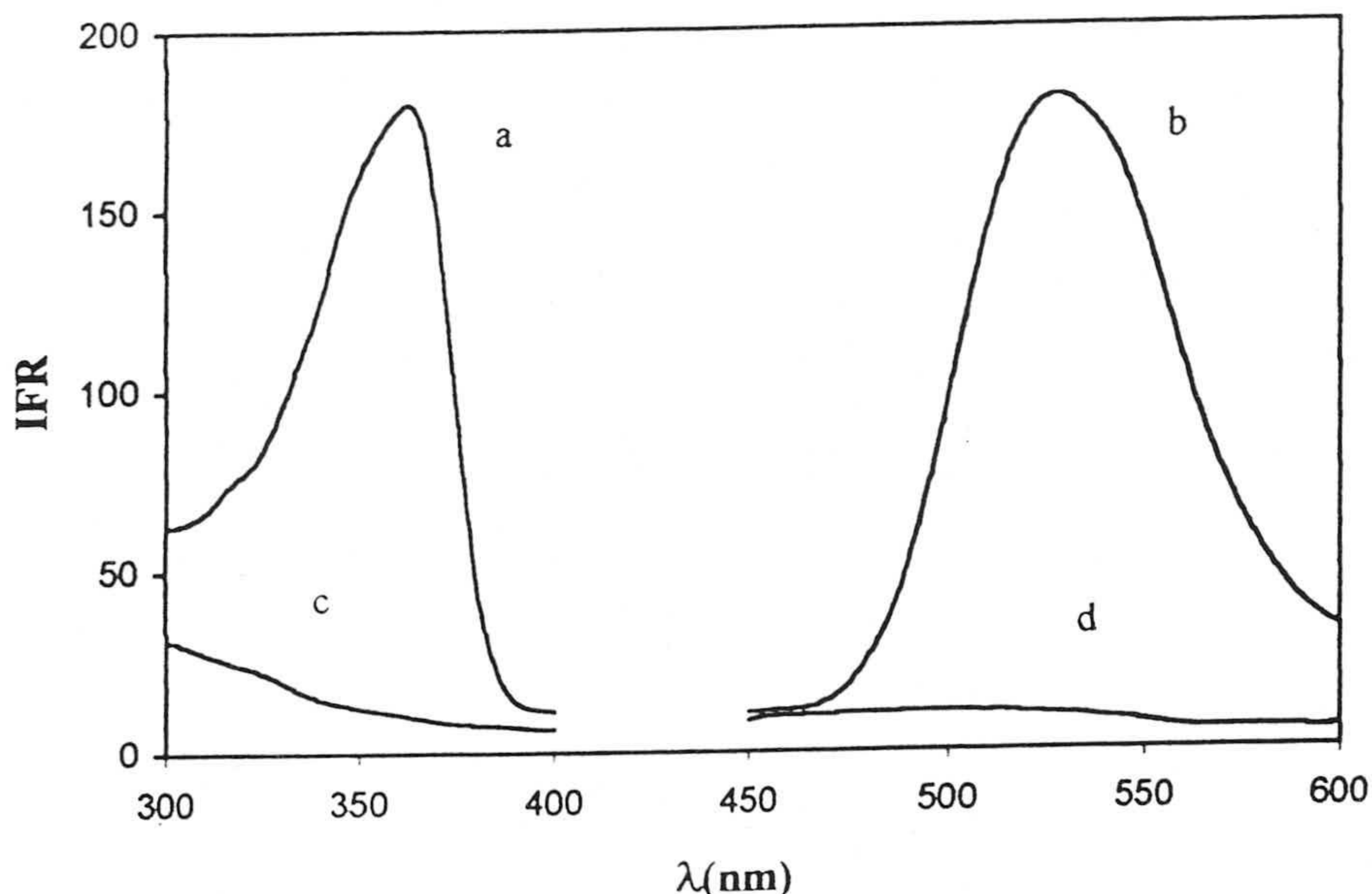


Figura 5.3. Espectros de excitación y emisión (a,b) de la muestra del TBZ (c;d) del blanco en fase sólida.

5.2. OPTIMIZACIÓN DE LAS VARIABLES EXPERIMENTALES

La optimización de cada una de las variables experimentales de la muestra así las como de las variables instrumentales, se llevó a cabo manteniendo constantes los valores de todas ellas, excepto el de aquella variable que se deseaba estudiar, estableciendo entonces su influencia sobre la intensidad de fosforescencia emitida por el analito. Procediendo de esta forma se estudiaron las siguientes variables experimentales: influencia de la naturaleza del soporte sólido, influencia de

la naturaleza, concentración y volumen de disolución de átomo pesado, influencia del oxígeno y de la humedad atmosférica, influencia del pH del medio y de la fuerza iónica del mismo, influencia del volumen de muestra depositada en el soporte sólido, tiempo de secado de la muestra y, finalmente, la influencia de las variables instrumentales: anchura de rendijas de excitación y emisión, tiempos de lectura del detector (t_g) y de retraso en su apertura (t_d).

5.2.1. Optimización de variables experimentales de la muestra.

Para ello se utilizó como señal analítica el máximo de fosforescencia del espectro de emisión registrado a 363 nm de excitación y las condiciones instrumentales anteriormente señaladas.

5.2.1.1. Elección del soporte sólido.

La elección del soporte sólido más adecuado se hizo como sigue: se prepararon muestras utilizando como soporte sólido papeles cromatográficos Whatman nº 1 y 4, papeles de cambio iónico Whatman P-81 (catiónico) y DE-81 (aniónico) y papel de filtro Albet Nº 1305 y se midió su fosforescencia, así como la de su respectivo blanco. Los datos obtenidos se recogen en la tabla 5.1.

Tabla 5.1. Influencia de la naturaleza del soporte sólido sobre la intensidad de fosforescencia

Tipo de soporte sólido	IF _{muestra}	IF _{blanco}	$\Delta(\text{IF})$
Papel Whatman nº 1	160,4	58,93	101,5
Papel Whatman nº 4	123,1	10,32	112,8
Papel Whatman P-81	224,5	189,4	35,10
Papel Whatman DE-81	446,3	340,3	106,0
Papel Albet nº 1305	320,8	230,5	90,31

Los valores de intensidad de fosforescencia (IF) que figuran en esta tabla, son la media de tres determinaciones diferentes.

De los resultados obtenidos en la anterior tabla 5.1 se pudo concluir que el papel cromatográfico Whatman N°4 es el que, en igualdad de condiciones, permite obtener una intensidad de blanco mas baja y, por tanto, una mayor intensidad de fosforescencia relativa, razón por la que se eligió como soporte sólido para posteriores experiencias.

5.2.1.2 Selección del átomo pesado

Con la intención de incrementar la intensidad de fosforescencia se ensayaron una serie de metales pesados en formas de nitratos y acetatos, así como aniones voluminosos, mientras se mantenían constantes el resto de las variables experimentales. Las especies ensayadas fueron: Pb(II), Ag(I), Tl(I), Hg(II), fluoruro, cloruro, bromuro y yoduro. En las tablas 5.2 y 5.3 se resumen los resultados obtenidos.

Tabla 5.2. Influencia de los metales pesados sobre la IF del MOR.

Metal	IF _(m)	IF _(B)	IFR _(m)	DNR%
sin	125.4	10.2	115.2	2.7
Tl(I)	136,5	44,0	92,5	3,2
Hg(II)	159,8	44,3	115,5	3,1
Ag(I)	150,6	43,8	106,8	2,5
Pb(II)	142,6	42,4	100,2	2,9

Tabla 5.3. Influencia de los halogenuros sobre la intensidad de fosforescencia del MOR.

halogenuros	IF _(m)	IF _(B)	IFR _(m)	DNR(%)
F ⁻	114,5	12,3	104,2	2,5
Cl ⁻	125,9	19,5	105,4	2,9
Br ⁻	100,5	19,8	70,70	3,1
I ⁻	58,81	19,7	29,10	3,4

Datos promedio de tres determinaciones diferentes.

IFR(m): Intensidad de fosforescencia relativa.

DNR(%): Desviación normal relativa.

Dado que no hay diferencia significativa entre las intensidades de fosforescencia relativas obtenidas con las especies ensayadas y la que se obtiene sin agregar átomo pesado, se decidió no utilizar ninguno de ellos en próximas experiencias, lo cual no suele muy habitual.

5.2.1.5. Uso de láminas de cuarzo para medir la intensidad de fosforescencia.

Como se ha mencionado en capítulos anteriores para disminuir el efecto de atenuación o “quenching”, tanto el producido por el oxígeno atmosférico como por la humedad, se pensó en utilizar dos láminas de cuarzo, entre las que colocar la muestra en el momento de medir y comprobar el efecto producido sobre la fosforescencia medida. Las experiencias se realizaron como en casos anteriores comprobando todas las posibilidades de uso o no de las láminas y la utilización de atmósfera de N₂ o sin ella. Los resultados obtenidos figuran en la tabla 5.4 y se representan en la figura 5.4.

Tabla 5.4. Influencia del uso de láminas de cuarzo y corriente de nitrógeno sobre la IFR del MOR.

T (min)	IFR CSN	IFR CCN	IFR SCN	IFR SSN	T (min)	IFR CSN	IFR CCN	IFR SCN	IFR SSN
0	61,1	63,3	38,1	31,5	16	55,3	58,3	29,1	14,0
1	63,2	64,4	38,3	31,5	18	53,8	57,5	28,2	13,1
2	62,1	63,5	38,5	30,2	20	52,3	5	26,3	12,2
4	62,0	63,3	37,5	26,5	22	51,5	56,2	25,6	11,5
6	61,3	62,2	36,1	24,0	24	49,4	55,5	25,1	11,5
8	60,2	61,5	34,5	20,6	26	47,6	54,3	23,3	11,2
10	59,1	61,1	32,2	18,8	28	45,5	53,9	22,5	11,0
12	58,4	60,7	31,3	16,4	30	43,7	53,1	22,2	10,8
14	56,3	59,5	30,2	15,1					

*CCN: Con láminas y corriente de nitrógeno.

*CSN: Con láminas y sin corriente de nitrógeno. *SCN: Sin láminas y con corriente de nitrógeno. *SSN: Sin láminas ni corriente de nitrógeno.

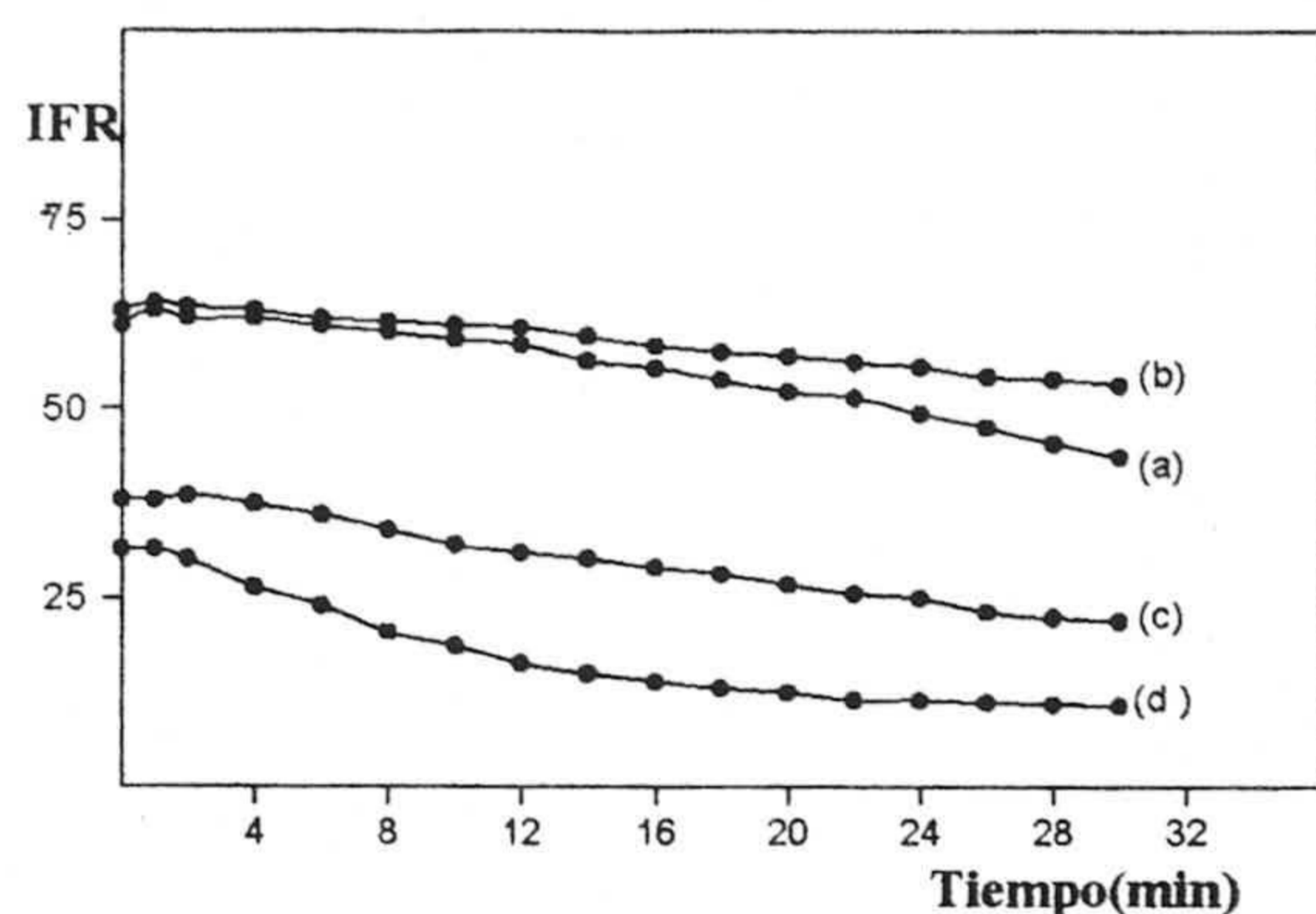


Figura.5.4. Intensidad de fosforescencia

- (a) Con láminas, sin N₂.
- (b) Con láminas y N₂.
- (c) Sin láminas con N₂.
- (d) Sin láminas sin N₂.

De los resultados obtenidos podemos deducir que la utilización de láminas de cuarzo incrementa sensiblemente la señal de fosforescencia producida por el analito tanto en atmósfera inerte de N₂ como sin ella, al menos durante los primeros 7 minutos después de la preparación de la muestra. En consecuencia las medidas de fosforescencia en próximas experiencias se realizarán antes de 7 minutos desde la preparación de la muestra y sin utilizar atmósfera inerte de N₂.

5.2.1.6. Influencia del pH del medio

Para establecer la influencia que ejerce el pH del medio sobre la intensidad fosforescente del MOR, se preparó una serie de disoluciones de MOR de 1,0 mg.-L⁻¹ en matraces aforados de 25 mL de capacidad, manteniendo en todos los casos una proporción de etanol del 10% en volumen. A continuación, usando disoluciones de ácido clorhídrico o hidróxido sódico de distintas concentraciones, se ajustó el pH al valor deseado. Con las anteriores disoluciones de MOR con distintos valores de pH, se prepararon las muestras de la forma descrita anteriormente y se registraron sus espectros bajo las siguientes condiciones: $\lambda_{ex} = 363$ nm, $\lambda_{em} = 527$ nm,

rendijas (ex/em) = 5/10 nm, velocidad de barrido $240 \text{ nm}\cdot\text{min}^{-1}$ $t_g = 0,15 \text{ ms}$ y $t_d = 10 \text{ ms}$. Los resultados obtenidos los podemos ver en la tabla 5.5, y en la figura 5.5.

Figura 5.5. Influencia del pH sobre la IFR del MOR.

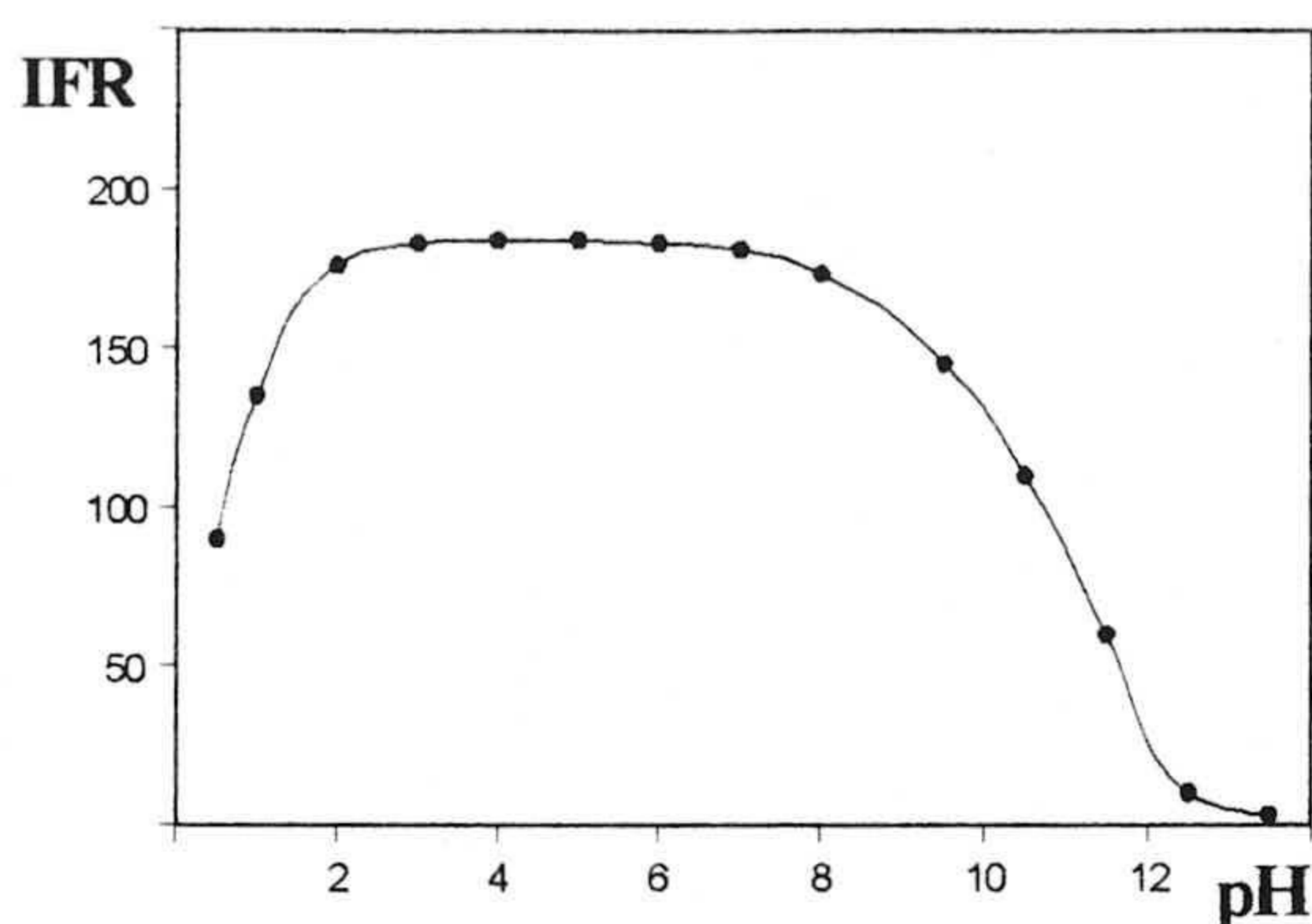


Tabla 5.5.

pH	IFR	pH	IFR
0,5	81,5	7,0	181,1
1,0	135,4	8,0	180,5
1,5	155,6	8,5	178,6
2,5	178,3	9,5	165,3
3,0	181,0	10,0	125,0
3,7	184,6	10,5	110,6
4,5	184,5	11,5	60,4
5,5	183,7	12,5	9,1
6,0	183,1	13,5	3,1

La observación de la figura anterior nos permite confirmar que desde un pH de 8,5 hasta 2,5 la intensidad fosforescente no cambia significativamente, mientras que por debajo de 2,5 y por encima de 9,0 la intensidad fosforescente del MOR disminuye de forma brusca. Este cambio en la emisión de fosforescencia lo podemos atribuir al proceso de hidrólisis que sufre la molécula de morestan a pH aproximadamente 11,5 dando como resultado la formación de 2,3-dimercapto-6-metilquinoxalina [1].

Puesto que el pH natural de la disolución de MOR se encuentra en la zona central del intervalo en el cual la fosforescencia es máxima, podemos trabajar sin necesidad de utilizar disolución reguladora de pH.

5.2.1.7. Influencia de la fuerza iónica.

Para llevar a cabo este estudio se prepararon disoluciones de MOR, en las que la concentración de MOR era $1,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, con cantidades crecientes de NaCl

hasta 2,0 M como electrólito. Los resultados experimentales obtenidos son los que figuran en la tabla 5.6 donde podemos ver que hasta una concentración de NaCl 2,0 M la intensidad de fosforescencia emitida por el MOR se mantiene constante.

Tabla 5.6.

[NaCl] M	IFR	DNR(%)
0,00	115,3	1,8
0,05	117,2	2,3
0,10	116,6	2,5
0,20	119,9	2,7
0,40	118,7	3,2
0,60	116,9	2,7
0,80	116,8	3,0
1,00	117,0	2,5
1,25	115,9	3,1
1,50	119,6	2,7
1,75	116,6	2,8
2,00	118,9	1,9

Resultados que contrastan con los encontrados para carbaril y tiabendazol y que se puede deber a la precipitación de los respectivos átomos pesados, cosa que aquí no ocurre al no haber átomo pesado

5.2.1.8. *Influencia del volumen de muestra depositada en el papel.*

Entre las variables experimentales relativas a la muestra que influyen en la intensidad de fosforescencia, nos encontramos el volumen de ella depositado sobre el soporte sólido. Para estudiar esta influencia se prepararon diferentes muestras en las que el volumen depositado variaba entre 0,5 y 9,0 μL , manteniendo constantes las restantes variables experimentales. Los resultados obtenidos que son la media de tres medidas independientes, se resumen en la tabla 5.7 y se representan en la figura 5.6.

Figura 5.6. Influencia del volumen de muestra en la IFR del MOR.

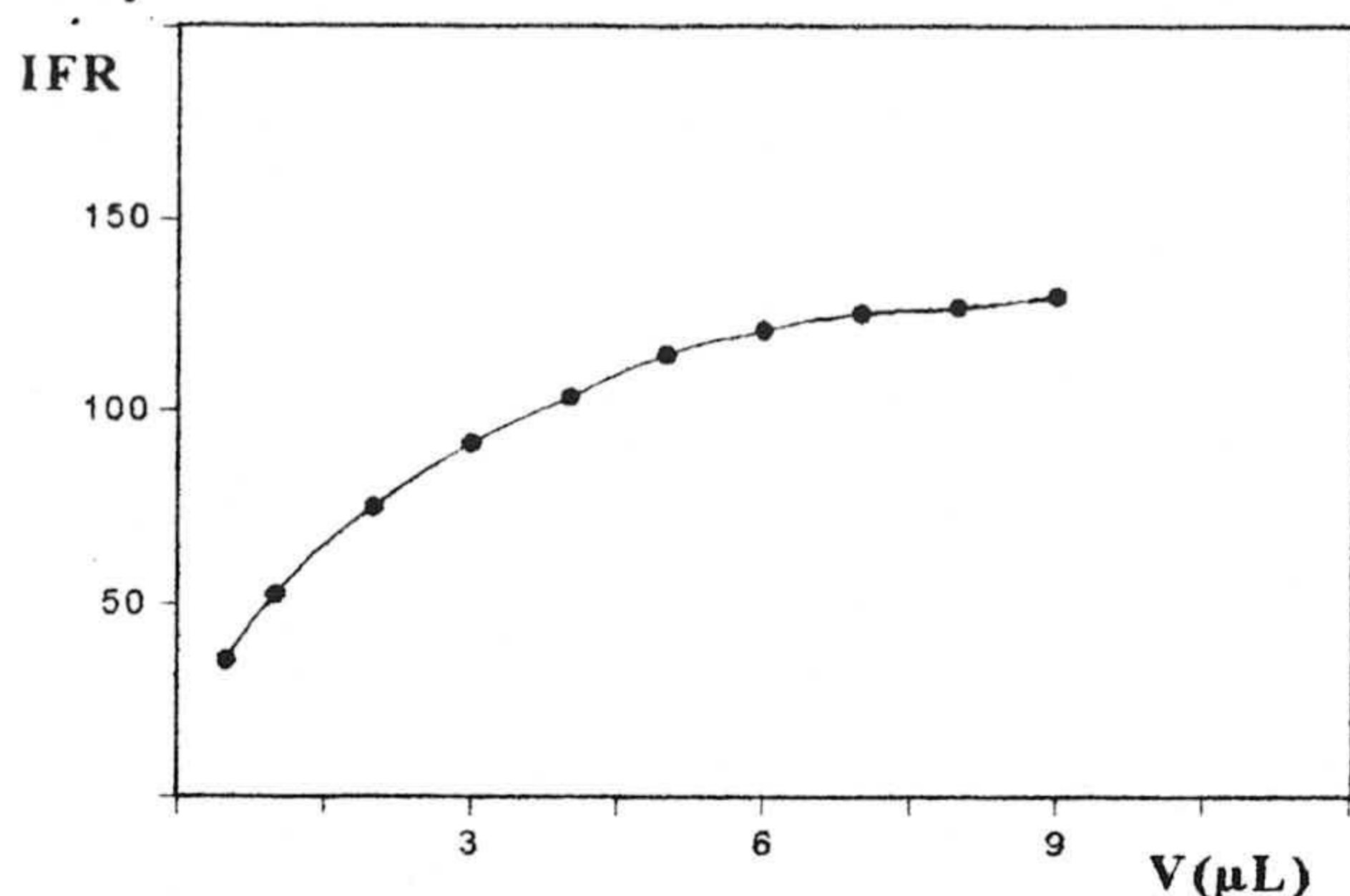


Tabla 5.7.

V(μL)	IFR	DNR(%)
0,5	35,53	3,1
1,0	52,70	2,0
2,0	75,32	1,5
3,0	90,21	2,0
4,0	103,0	1,5
5,0	114,9	0,8
6,0	121,3	1,2
7,0	125,8	1,1
8,0	127,3	1,3
9,0	130,2	2,1

Como conclusión de esta experiencia se puede decir que 5 μL de disolución de MOR son suficientes para cubrir la superficie de la tira de papel irradiada por el haz de excitación produciendo así la máxima intensidad de fosforescencia ya que un mayor volumen de muestra no produce un incremento apreciable de la señal fosforescente y sí un aumento en la desviación normal relativa, razón por lo que se eligió 5 μL como volumen idóneo en próximas experiencias.

5.2.1.9. Influencia del tiempo de secado

Para establecer la influencia que ejerce este parámetro se realizó una experiencia en la que se midió la señal de fosforescencia transmitida por distintas muestras secadas bajo la corriente de aire caliente que produce un secador de pelo doméstico. Las muestras se prepararon secando durante distintos periodos de tiempo comprendidos entre 0,5 y 7 minutos, utilizando una potencia de 250 vatios y colocando el secador a 10 cm de distancia de la muestra. Los datos obtenidos para tres réplicas independientes se resumen en la tabla 5.8 y se representan en la figura 5.7.

Figura 5.7. Influencia del tiempo de secado sobre la IFR del MOR.

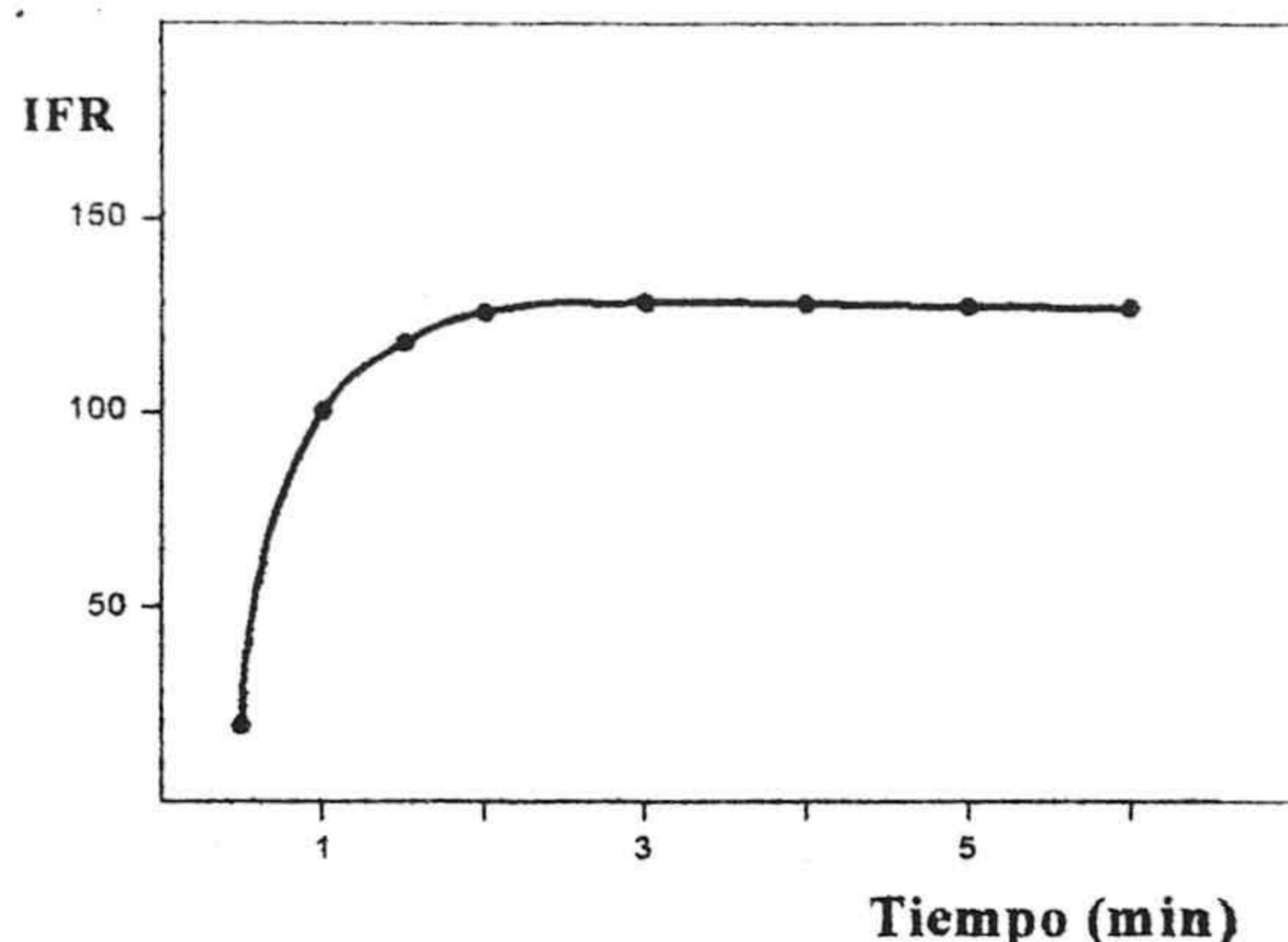


Tabla 5.8

T(min)	IFR	DNR%
0,5	19,5	4,2
1,0	100,3	2,9
1,5	118,5	1,8
2,0	125,9	2,1
3,0	128,5	1,9
4,0	128,2	1,1
5,0	127,5	1,5
6,0	126,9	2,8
7,0	125,8	3,1

Como se observa en la figura 5.10 el valor máximo de intensidad fosforescencia se alcanza a los 2 minutos de secado permaneciendo estable para mayores valores de tiempo.

5.2.2. Optimización de variables instrumentales.

Las medidas de la señal fosforescente están muy condicionadas por los valores de las siguientes variables instrumentales: anchura de las rendijas de emisión y excitación, tiempo de lectura del detector (t_g) y tiempo de retraso en su apertura (t_d).

5.2.2.1. Optimización las rendijas de excitación y de emisión.

Para optimizar los valores correspondientes a las anchuras de las rendijas de excitación y emisión, se registraron los espectros de emisión de diferentes muestras preparadas en la forma indicada en experiencias anteriores, efectuando las medidas de fosforescencia a $\lambda_{exc}= 363$ nm, $\lambda_{em}=527$ nm, variando alternativamente las rendijas de emisión y excitación y manteniendo constantes los demás parámetros instrumentales. De los resultados obtenidos se deduce que 2,5 y 10 nm, para

excitación y emisión respectivamente, son los valores más favorables para el desarrollo de una mayor intensidad de fosforescencia.

5.2.2.2. Optimización de los tiempos de retraso y de lectura del detector (t_g y t_d).

Para llevar a cabo el estudio de estas variables instrumentales se procedió de forma similar a la del apartado anterior, midiendo la intensidad de fosforescencia para tiempos de retraso (t_d) comprendidos entre 0,1 y 0,3 ms y tiempos de lectura del detector (t_g) comprendidos entre 1 y 12 ms. Los resultados obtenidos en esta experiencia se resumen en la tabla 5.9.

Tabla 5.9. Influencia de t_g y t_d sobre la IFR

t_d (ms)	T_g (ms)	IFR	t_d (ms)	T_g (ms)	IFR
0,10	6	50,83	0,20	6	66,85
0,10	8	73,50	0,20	8	82,43
0,10	10	93,90	0,20	10	106,3
0,10	12	110,7	0,20	12	125,9
0,15	6	65,33	0,30	6	67,91
0,15	8	83,85	0,30	8	85,33
0,15	10	103,4	0,30	10	104,8
0,15	12	128,7	0,30	12	130,2

De los resultados obtenidos se puede deducir que al aumentar el tiempo de lectura del detector, manteniendo constante el tiempo de retraso, aumenta la intensidad fosforescente emitida observándose un incremento similar en todas los casos, mientras que al aumentar del tiempo de retraso, manteniendo el de lectura la intensidad emitida es prácticamente la misma cualquiera que sea el valor de t_d . Los valores elegidos fueron: $t_g = 12$ y $t_d = 0,15$.

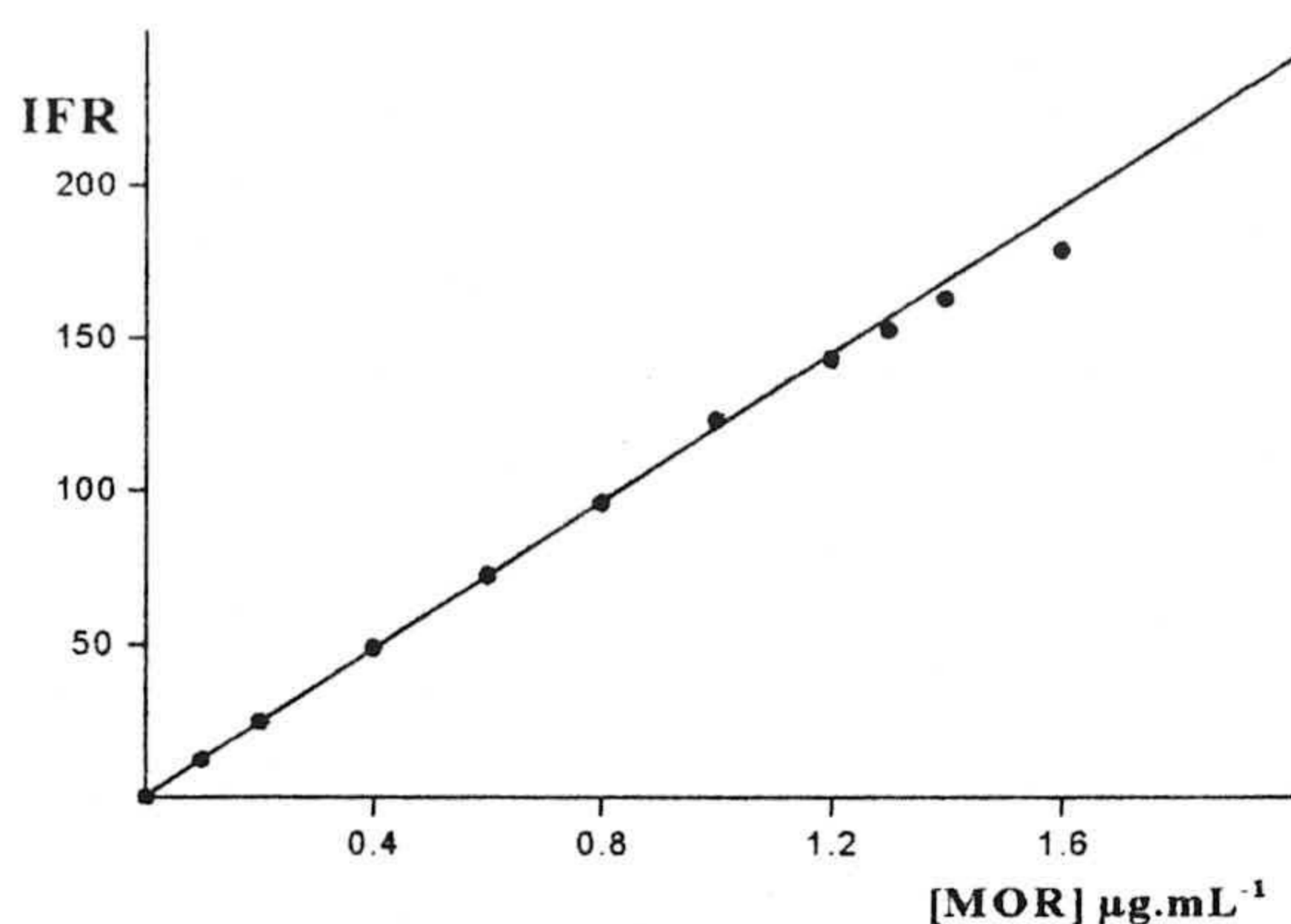
5.3. PROCEDIMIENTO OPERATORIO

Una vez optimizadas las variables experimentales, tanto las referentes a la preparación de la muestra como a las propiamente instrumentales, podemos establecer el siguiente procedimiento operatorio: sobre una tira de papel Whatman N° 4 de 4,5x1,2 cm, se depositan 5 μL de disolución de muestra. A continuación, se seca mediante una corriente de aire caliente durante dos minutos; se coloca la tira de papel entre dos láminas de cuarzo y se introduce en el compartimento de muestras del instrumento, formando un ángulo de 45° con el haz de excitación y se mide la intensidad de fosforescencia transmitida a temperatura ambiente a $\lambda_{\text{exc}} = 363 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 527 \text{ nm}$, $t_g = 12 \text{ ms}$ y $t_d = 0,15 \text{ ms}$.

5.4. ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE CONCENTRACIÓN Y SEÑAL ANALÍTICA

Con objeto de conocer la zona de linealidad y la forma en que varía la intensidad de fosforescencia transmitida en función de la concentración de MOR, se realizó la siguiente experiencia: en matraces aforados de 25 mL de capacidad se introdujeron cantidades crecientes de disolución de MOR de $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de concentración y se enrasó a continuación con una mezcla etanol /agua (10%v/v). De cada uno de estos matraces se prepararon tres muestras replicadas independientes y se procedió a la lectura de sus respectivas emisiones fosforescentes. Los datos obtenidos se resumen en la tabla 5.10 y se representan en la figura 5.8.

Como podemos apreciar en la citada figura hay una relación lineal entre la intensidad fosforescente transmitida a temperatura ambiente y la concentración de MOR hasta un valor de $1,20 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Para valores superiores de concentración la relación deja de ser lineal.

Figura 5.8. Influencia de la concentración de MOR.**Tabla 5.10.**

[MOR] µg.mL ⁻¹	IFR
0,1	12,3
0,2	24,2
0,4	48,8
0,6	72,7
0,8	96,3
1,0	123,2
1,2	143,1
1,3	150,5
1,4	159,2
1,6	173,8

Tabla 5.11. Resumen de los valores óptimos de las variables experimentales.

Variables	Valor óptimo	Variables	Valor óptimo
Soporte sólido	Papel W4	λ_{exc}	363 nm
Metal pesado	ninguno	λ_{em}	527 nm
Volumen de muestra	5 µL	Rendija excitación	5 nm
Tiempo de secado	2 min	Rendija emisión	10 nm
Tipo de secado	Corriente de aire caliente	t_d	0,15 ms
Ángulo de incidencia	45°	t_g	12 ms

5.5. PARÁMETROS ANALÍTICOS.

5.5.1. Recta de calibrado

Se estableció la recta de calibrado mediante la siguiente experiencia: se preparó una serie de matraces aforados de 25 mL en los que introdujeron concentraciones crecientes de MOR comprendidas entre 0,1 y 1,2 mg.L⁻¹ de concentración y etanol /agua (10%v/v) hasta el enrase. A continuación, de cada una de estas disoluciones se prepararon tres muestras replicadas de acuerdo con el procedimiento operatorio establecido y se midieron sus intensidades de fosforescencia en

las condiciones anteriormente fijadas. Con los resultados experimentales obtenidos se confeccionó la tabla 5.13 y de ellos se obtuvo la recta de calibrado que representamos en la figura 5.9.

Figura 5.9. Recta de calibrado.

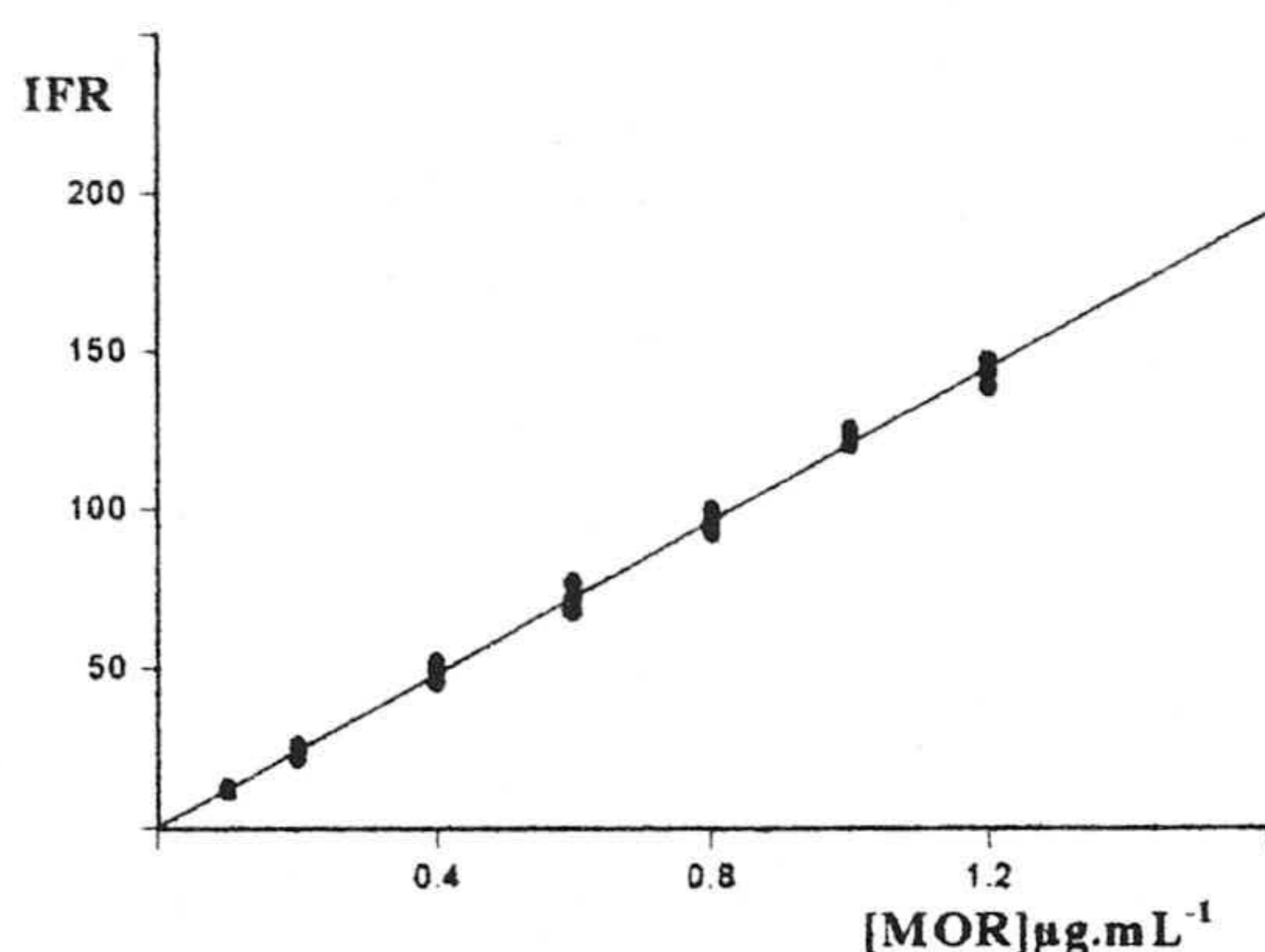


Tabla 5.12.

[MOR] μg.mL ⁻¹	IFR (tres réplicas)		
0,1	11,8	12,0	13,4
0,2	26,3	22,1	24,1
0,4	48,4	45,9	52,1
0,6	68,3	72,4	77,3
0,8	99,9	96,1	93,0
1,0	123,4	120,4	125,3
1,2	147,1	143,5	138,7

En la tabla 5.13, se indican los principales parámetros estadísticos de la ecuación de la recta de calibrado obtenida a partir de los datos de la tabla 5.12 efectuando el ajuste mediante regresión lineal simple por mínimos cuadrados.

Tabla 5.13. Valores de los parámetros estadísticos del calibrado.

Parámetros	Valores encontrados
n	21
m	3
a	0,44
b	120,3
S _a	1,23
S _b	1,70
S _{R,C}	2,96
P _{R,C} (lack of fit)	76,71
R ²	0,996

- a: Ordenada en el origen.
- b: Pendiente
- S_a: Desviación normal de la ordenada en el origen.
- S_b: Desviación normal del pendiente.
- R: Coeficiente de correlación.
- R²: Coeficiente de determinación.
- S_{R,C}: Desviación normal de regresión.
- P_{R,C}: Nivel de significación para el test de fallo de ajuste (lack of fit).

Aplicando el test de fallo de ajuste, se observó que hay un buen ajuste del modelo, ya que $p > 5\%$ ($p = 76,71$) para un nivel de confianza del 95%. Por otra parte, el análisis de la varianza (ANOVA) realizado en el intervalo lineal comprendido entre 0,10 y 1,20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ revela que existe un buen ajuste lineal del modelo así como la ausencia de curvatura.

Tabla 5.14. Resultados de ANOVA correspondiente a los datos de la tabla.

Fuente	S.C	g.l	M.C	F _{exp}	P(%)
Modelo	43787,24	1	43787,24	5012,74	0,0000
Residuales	165,97	19	8,74		
Fallo de ajuste	25,4	5	5,08		76,71
Error puro	140,6	14	10,0		
Total	43953,21	20			

S.C: Suma de cuadrado.

M.C: Media de cuadrado.

En consecuencia, admitiendo que se cumplen las hipótesis matemáticas del modelo de mínimos cuadrados (normalidad, aleatoriedad e independencia) se obtiene la siguiente función de calibrado.

$$\text{IFR} = 120,3[\text{MOR}] + 0,44$$

Estando [MOR] expresado en $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Seguidamente utilizando las expresiones que se proponen en el capítulo 1 de esta Memoria se procedió al cálculo de los siguientes parámetros analíticos:

5.5.2. Linealidad: $\text{Lin}(\%) = [1 - \text{DNR}(b)] \times 100 = [1 - 0,014] \times 100 = 98,6 \%$

donde: $\text{DNR}(b) = S_b/b = 1,7/120,3 = 0,014 \mu\text{g.mL}^{-1}$

5.5.3. Sensibilidad: a) Sensibilidad de calibrado: $S_{\text{cal}} = b = 120,3 (\mu\text{g/mL})^{-1}$.

b) Sensibilidad analítica: $S_{\text{anal}} = S_{R,C}/b = 2,96/120,3 = 0,025 \mu\text{g.mL}^{-1}$

5.5.4. Límites de detección y cuantificación

El cálculo de los límites de detección y cuantificación se realizó, siguiendo las normas de IUPAC, utilizando 10 disoluciones blanco a las que se les aplicó el procedimiento operatorio propuesto. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 5.16.

Tabla 5.15. Repetibilidad del blanco.

Disolución nº	IF(blanco)
1	10,1
2	10,4
3	10,1
4	10,1
5	10,3
6	10,2
7	10,7
8	10,8
9	10,4
10	10,5

$$\bar{X} = 10,36$$

$$S_{n-1} = 0,250$$

$$DNR = 2,4\%$$

\bar{X} = Valor medio de la señal de los blancos.

S_{n-1} = Desviación normal de los valores del blanco.

DNR% = Desviación normal relativa.

Para calcular los valores de los límites de detección y de cuantificación se utilizaron los resultados obtenidos de la tabla 5.16 y las definiciones de límite de detección y límite de cuantificación recomendadas por la IUPAC obteniéndose los siguientes resultados:

Límite de detección: $LD = 3s/b = 0,0062 \mu\text{g.mL}^{-1}$

Límite de cuantificación: $LQ = 10s/b = 0,021 \mu\text{g.mL}^{-1}$

5.5. Rango dinámico lineal

El intervalo de aplicación del método está comprendido entre el límite inferior, tomando como tal el límite de cuantificación, y el límite superior que viene

determinado por el valor superior del intervalo lineal de concentraciones calculado mediante el test de fallo de ajuste, es decir:

$$RDL = 0,1 (\text{Lim}_{\text{sup}}/\text{Lim}_{\text{inf}}) = 0,1 (1,20/0,021) = 5,71$$

5.5.6 Precisión

Para determinar la precisión del método se usaron las dos formas establecidas anteriormente en el capítulo 1 de esta Memoria, obteniéndose los siguientes resultados:

a) Repetibilidad del método propuesto aplicado a una muestra patrón.

A partir de 10 disoluciones de MOR concentración de $1,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ se obtuvieron los datos que figuran en la tabla 5.16 de los que obtenemos los valores que figuran en el recuadro situado al margen de la misma.

Tabla 5.16. Repetibilidad del método.

Disolución nº	IFR	Disolución nº	IFR
1	121,4	6	122,8
2	119,7	7	124,2
3	120,0	8	119,4
4	119,0	9	121,8
5	121,1	10	123,9

$\bar{x} = 121,34$ $S_{n-1} = 1,76$ $DNR = 1,5\%$

b) Repetibilidad del método a partir de los datos del calibrado.

En la siguiente tabla 5.18 se indican los valores de la precisión en función de la concentración, valores que se representan en la figura 5.13.

Figura 5.10. Repetibilidad en función de la concentración de MOR.

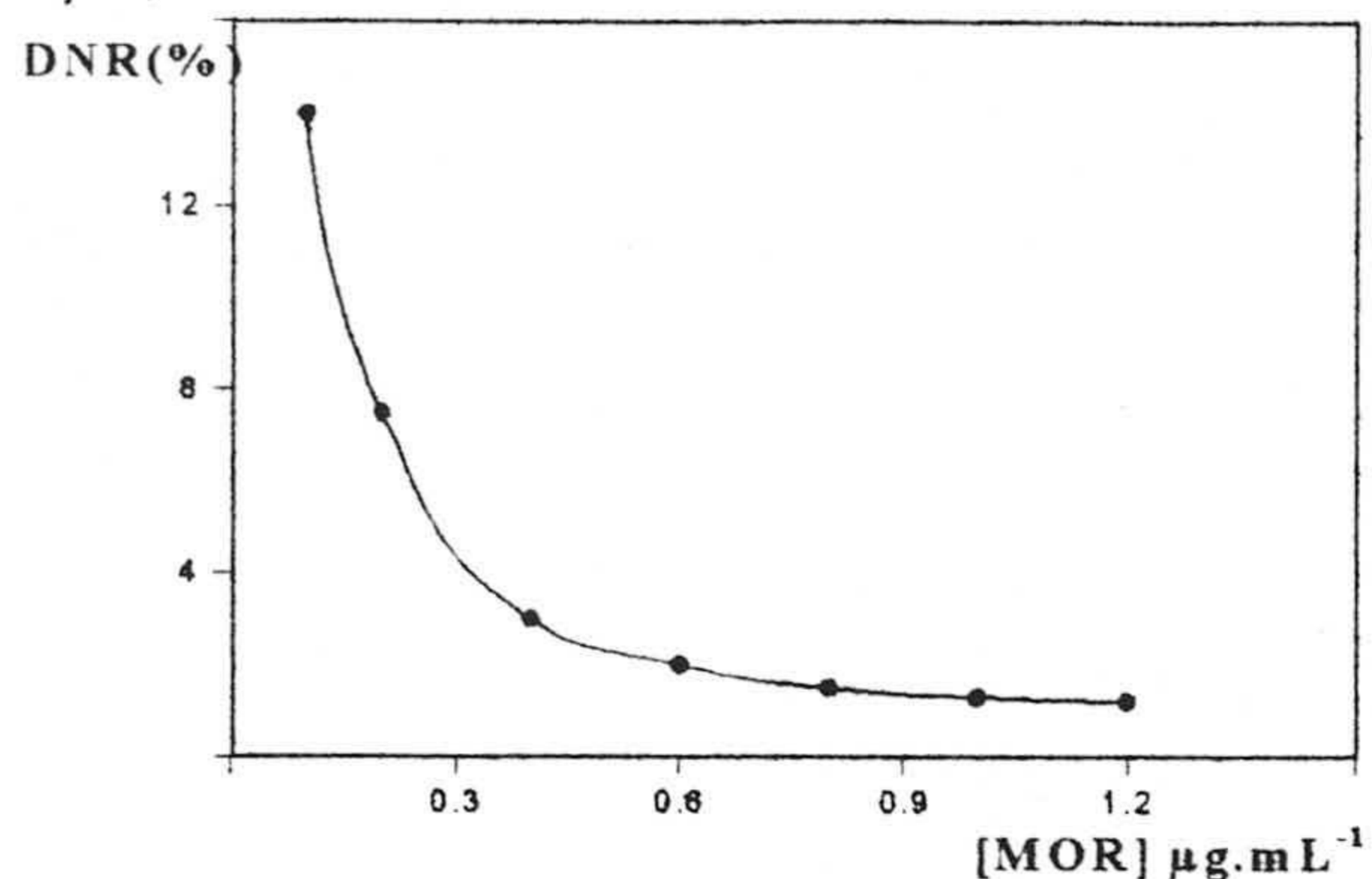


Tabla 5.17.

[MOR] $\mu\text{g.mL}^{-1}$	S_c	DNR (%)
0,10	0,014	14,0
0,20	0,015	7,5
0,40	0,012	3,0
0,60	0,012	2,0
0,80	0,012	1,5
1,00	0,013	1,3
1,20	0,015	1,2

En la figura 5.10 podemos observar, que a medida que aumenta la concentración de analito, la desviación estándar relativa se hace cada vez menor.

Tabla 5.18 Resumen de los parámetros analíticos del método.

Parámetros	Valor
RDL	5,71
Linealidad (%)	98,6
Sensibilidad calibrado ($\mu\text{g}/\text{mL})^{-1}$	120,30
Sensibilidad analítica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0,0250
LD ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0,0062
LQ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0,0210
r^2	0,9964
Fallo de ajuste %	76,71

5 6. ESTUDIO DE LAS INTERFERENCIAS.

Un aspecto importante a la hora de establecer un nuevo método de análisis es el conocimiento cuantitativo de la influencia que puede ejercer la presencia de interferentes (pesticidas fosforescentes o no fosforescentes y especies iónicas frecuentes en aguas) en la determinación del analito en estudio.

Para llevar a cabo este estudio se prepararon disoluciones que contenían $0,6 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de MOR, en matraces aforados de 25 mL de capacidad y concentraciones crecientes de cada una de las especies extrañas, manteniendo como siempre la proporción adecuada de etanol. Efectuado las medidas de fosforescencia y utilizando la recta de calibrado, se determinó en cada caso el error relativo que origina la presencia de la especie interferente.

Hemos admitido como límite de tolerancia para la especie interferente, la concentración de esta que origina un error relativo superior de 5%. Los resultados obtenidos están resumidos en la tabla 5.19.

Tabla 5.19. El nivel de tolerancia a las sustancias extrañas.

Iones y especies interefrentes	Tolerancia ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
Diclon, Captan, Lindano Folpet, Paraquat, Dicuat. Benomilo, Terbutrin, Ácido húmico. Warfarina. Carbaril	no interfiere > 50,0 ó nivel saturación en agua.
1-Naftol	no interfiere
1-Fenilfenol	no interfiere
Tiabendazol	> 25,0
Carbendazima	no interfieren
Li^+ , Na^+ , K^+ y NH_4^+	no interfieren
F^- , Cl^- , y Br^-	no interfieren
SO_4^{-2} , NO_3^- , PO_4^{-3}	>50,0
Mg^{+2} , Mn^{+2} , Cu^{+2} , Ca^{+2}	>100,0
Al^{+3} , Fe^{+3}	> 50,0
Be^{+2}	7,0

Como podemos apreciar, las especies iónicas más frecuentes en agua y los pesticidas de uso común en agricultura, no ejercen una gran influencia como interferentes en la determinación de MOR ya que, con la excepción del ion Be^{2+} , las demás especies ensayadas no interfieren o lo hacen a partir de concentraciones relativamente altas.

5.7. APLICACIONES ANALÍTICAS

Puesto que el MOR se utiliza en determinados cultivos agrícolas desde los que el pesticida puede pasar a ríos, mares, embalses de los que se surte de agua potable una ciudad o a manantiales de agua natural, hemos escogido diferentes tipos de aguas, representativas de estos casos, en las que puede darse la circunstancia de encontrar MOR de forma fortuita. Así mismo se han escogido algunos de los productos agrícolas en los que se utiliza MOR durante su cultivo o almacenamiento.

5.7.1. Determinación de MOR en aguas.

Se eligieron como casos representativos aguas de diferente procedencia: agua potable de la ciudad de Granada, agua del río Genil, agua del mar Mediterráneo (puerto de la ciudad de Motril) y aguas minerales de Fontdor, Lanjarón y Font Vella y en ningún caso se detectó la presencia de MOR, o la cantidad presente de dicho pesticida era inferior al límite detectable por el método propuesto. Por ello, se efectuó un estudio de recuperación de MOR en dichas aguas con objeto de comprobar la eficacia del método en este tipo de muestras reales.

5.7.1.1. Recuperación en aguas minerales, de río y potable.

Para llevar a cabo este estudio, se realizó la siguiente experiencia: en tres matraces de 25 mL, se prepararon tres disoluciones de MOR, de las siguientes concentraciones: 0,4; 0,6 y 0,8 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, enrasando hasta el volumen total con agua problema correspondiente y manteniendo constante el porcentaje del etanol. A continuación se prepararon las correspondientes muestras, según el procedimiento establecido y se efectuaron las medidas de fosforescencia en las condiciones habi-

tuales. En todos los casos se prepararon y midieron tres réplicas para cada muestra. Los valores de intensidad de fosforescencia medidos se trasladaron a la recta de calibrado y se evaluó la concentración de analito recuperado de la correspondiente muestra. Los resultados obtenidos se resumen en las tablas 5.20.

Tabla 5.20. Recuperación de MOR en aguas.

Agua de Lanjarón				Agua de Font Vella			
[MOR] _p	[MOR] _e	%R _m (S _{n-1})	% DNR	[MOR] _p	[MOR] _e	%R _m (S _{n-1})	% DNR
0,4	0,399	99,7(4,07)	4,08	0,4	0,401	100,1(2,51)	2,51
0,6	0,608	101,4(3,93)	3,88	0,6	0,6	100,0(3,16)	3,16
0,8	0,796	99,5(1,93)	1,94	0,8	0,805	100,6(2,36)	2,35

Agua de Fontdor				Agua del Río Genil			
[MOR] _p	[MOR] _e	%R _m (S _{n-1})	% DNR	[MOR] _p	[MOR] _e	%R _m (S _{n-1})	% DNR
0,4	0,398	99,5(2,13)	2,15	0,4	0,397	99,29(2,53)	2,55
0,6	0,593	98,9(4,18)	4,22	0,6	0,603	100,53(2,33)	2,32
0,8	0,810	101,3(2,73)	2,70	0,8	0,787	98,48(1,56)	1,58

Agua potable de Granada.

[MOR] _p	[MOR] _e	%R _m (S _{n-1})	%DNR
0,4	0,401	100,16(2,51)	2,48
0,6	0,603	100,44(2,06)	2,05
0,8	0,807	100,84(2,46)	2,44

[MOR]_p: Puesto en $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$.

[MOR]_e: Encontrado en $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$.

R: Recuperación

DNR: Desviación normal relativa

5.7.1.2. Aplicación a agua de mar

En el caso del agua de mar, para evitar la posible influencia de la alta concentración de cloruro sódico, se ha empleado como estrategia de calibrado no sólo la recta de calibrado con patrones externos sino también el calibrado mediante adición de patrón con objeto de comparar los resultados obtenidos y establecer el protocolo de validación descrito en el capítulo 1 de esta Memoria. Ambos métodos

de calibración se llevaron a cabo después de filtrar el agua de mar a través de una membrana Millipore de 0,45 μm de tamaño de poro.

Para ello se preparó una serie de matraces aforados de 50 mL de capacidad, en los cuales se añadieron cantidades conocidas de la disolución patrón de MOR para obtener las siguientes concentraciones finales: 0,4; 0,6, y 0,8 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, las cantidades apropiadas de etanol y volúmenes constantes de agua de mar hasta el enrase. A continuación se agitaron las disoluciones durante un minuto y se prepararon las muestras correspondientes según el procedimiento establecido. Los resultados obtenidos utilizando la recta de calibrado con patrones externos, con tres réplicas para cada muestra, se recogen en la tabla 5.21.

Tabla 5.21. Recuperación de MOR en agua de mar.

[MOR] _p	[MOR] _e	%R(m)	(S _{n-1})	%DNR
0,4	0,396	98,9	(0,015)	3,86
0,6	0,604	100,6	(0,012)	1,92
0,8	0,803	100,4	(0,023)	2,90

m: Recuperación media de tres replicas.

Como podemos observar en la tabla anterior el porcentaje de recuperación en los tres casos estudiados no difiere significativamente del 100%. No obstante, para asegurarnos de la ausencia de efecto matriz en este tipo de agua, procedimos a efectuar dos nuevas recuperaciones del analito a dos concentraciones diferentes (0,4 y 0,7 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) a partir de agua de mar, operando en la forma que describimos a continuación.

Calibrado con adición de patrón (AC, AC1). En el primer caso (0,4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) se preparó una disolución de agua de mar colocando 5,0 mL de disolución patrón de

MOR de $10,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de concentración en un matraz aforado de 50 mL de capacidad y se enrasó con agua de mar. De esta disolución se tomaron alícuotas de 10 mL y se colocaron en matraces de 25 mL de capacidad, añadiendo a continuación 0, 0,20, 0,40 y $0,80 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de patrón de MOR y enrasando con agua, manteniendo en todo caso la proporción de etanol adecuada. Para el segundo caso ($0,7 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), se partió de 7,0 mL de disolución de MOR de $12,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ se colocaron en un matraz de 50 mL y se enrasó con agua de mar. De esta disolución se tomaron alícuotas de 10,0 mL, se colocaron en matraces de 25 mL y se procedió como en el caso anterior. Los resultados obtenidos figuran en las tablas 5.22, y 5.23 y se representan en la figura 5.12.

Tabla 5.22 Concentración MOR $0,4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

Tabla 5.23 Concentración MOR $0,7 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

[MOR] _{añadido}	IFR _{tres réplicas}			[MOR] _{añadido}	IFR _{tres réplicas}		
0,00	47,4	46,9	49,8	0,00	82,3	80,9	86,1
0,20	68,7	70,3	76,2	0,10	97,5	91,8	100,3
0,40	96,2	93,8	99,4	0,30	114,2	118,9	122,2
0,80	146,4	149,5	138,3	0,50	148,7	147,5	139,9

Calibrado de Youden

Para llevar a cabo la validación hemos aplicado el protocolo de calibrado de Youden explicado anteriormente en el capítulo 1, realizado sobre cantidades crecientes de muestra problema. Para ello se prepararon cuatro matraces de 25 mL de capacidad introduciendo distintas porciones de muestra a analizar (2,5; 5,0; 7,5 y 10 mL) y enrasando a 25 mL con etanol y agua 10%v/v.

Tras aplicar el procedimiento operatorio establecido se midieron las intensidades de fosforescencia obteniéndose los resultados que se recogen en la tabla 5.24, y se representan en figura 5.11.

Figura 5.11. Calibrado de Youden (YC).

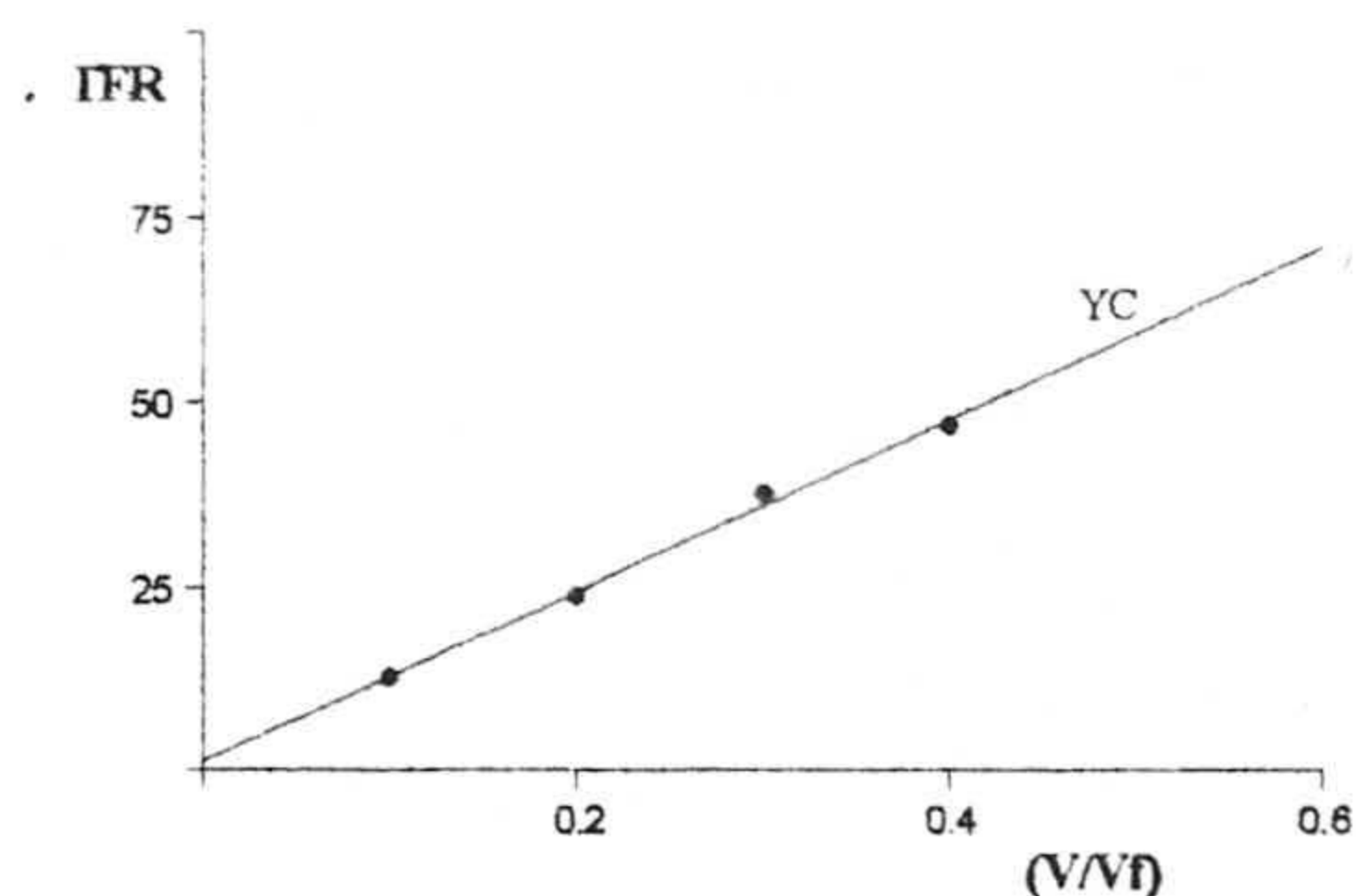


Tabla 5.24.

V/V _f	IFR
0,10	11,7
0,20	23,8
0,30	37,3
0,40	46,9

Los parámetros estadísticos correspondientes a las ecuaciones de las rectas de calibrado, SC, AC, AC₁ y YC se resumen en la tabla 5.25

Tabla 5.25. Valores numéricos de los parámetros correspondientes a los calibrados SC, AC y YC para recuperación de MOR en agua de mar.

Parámetros	SC	AC	AC ₁	YC
n	21	12	12	4
a	0,44	47,52	3,25	0,15
b	120,3	123,28	122,8	119,1
S _{x,y}	7	2,70	3.80	1,218
r ²	0,998	0,998	0,990	0,998
P _{x,y}	76,71	61,3	56,1

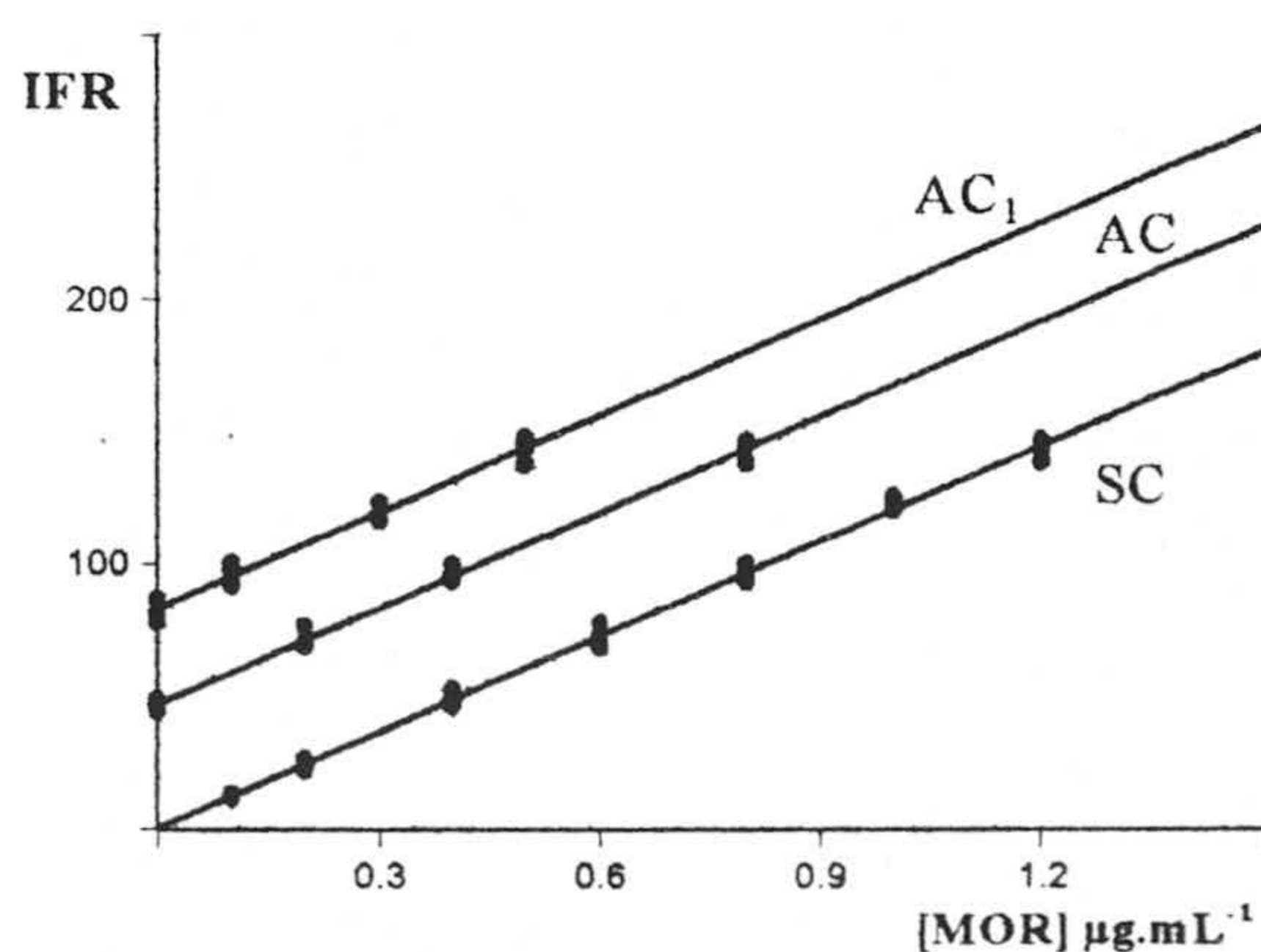


Figura 5.12. (a) Calibrado con patrones SC (b) Calibrado con adición de patrón AC y (c) Calibrado con adición de patrón AC₁.

De los resultados obtenidos se observa que hay buen ajuste del modelo de regresión lineal para los tres calibrados ya que $P > 5\%$. A partir de estos datos se aplica el protocolo estadístico de validación del método analítico en la determinación del analito en agua de mar.

Comparación de pendientes.

Los resultados del test de comparación de las pendientes se resumen en la tabla 5.26.

Tabla 5.26. Resultados de la comparación de los calibrados SC, AC y AC₁.

Parámetros	Valores
S_p	2,879
$S_p(1)$	3,279
$t(b)$	0,929 (P = 36,10%)
$t(b)_1$	0,483 (P = 63,26%)
b_p	121,0
$b_p(1)$	120,6
BY	0,138
BY(1)	-0,141

Se comprueba que el valor del estadístico del test de Student calculado $t(b)$ es menor que el valor t tabulado para un nivel de significación del 95% y $(n_{SC} + n_{AC} - 4)$ grados de libertad, por tanto no hay diferencia significativa entre las pendientes pudiéndose estimar un valor promedio b_p entre las pendientes de ambos calibrados para proseguir con la validación del método.

Calculo de la ordenada en el origen. Blanco de Youden

Los nuevos valores de a' , a'_A y a'_S (ordenadas en el origen para los calibrados AC, AC₁ y SC respectivamente) y del intervalo de confianza del calibrado con patrones, obtenidos mediante la utilización de los valores de pendiente promedio

b_p , desviación estándar promedio S_p y el valor de t de Student con $(n_s - 2)$ grados de libertad para un nivel de confianza del 95%, figuran en la tabla 5.27.

Tabla 5.27. Nuevas ordenadas en el origen, y intervalo de confianza sobre a_s .

Parámetros	SC	AC
a'	0,0118	48,307
Intervalo de confianza de a_s	[-2,49; 2,51]	
a_y	0,15	
Parámetros	SC	AC1
a'	0,2913	83,746
Intervalo de confianza de a_s	[-2,56; 3,14]	
a_y	0,15	

De los resultados que figuran en la tabla 5.27, se deduce que el blanco de Youden para el agua de mar está incluido en su correspondiente intervalo de confianza.

Comprobación de la exactitud.

Se llevó a cabo comparando el contenido de la muestra utilizando directamente la recta de calibrado con patrones y mediante el calibrado con adición de patrones. Esta comparación se llevó a cabo mediante el cálculo del estadístico $t(c)$. Los resultados obtenidas se resumen en la tabla 5.32.

Tabla 5.28. Comparación de la exactitud.

Parámetros	SC	AC
$C_{X,S}$	0,390
$C_{X,A}$	0,398
$t(c)$	0,8562(P = 39,89)	
Parámetros	SC	AC1
$C_{X,S}$	0,681
$C_{X,A}$	0,693
$t(c)$	1,112(P = 27,5)	
Valor crítico de t tabulado 2,042 (5%).		

A partir de los resultados obtenidos en la tabla anterior se observa que no existe discrepancia entre los resultados. En otras palabras podemos decir que no hay diferencia significativa entre los contenidos calculados y como $t(c)_{cal} < t(c)_{tab}$ para $(n_{SC} + n_{AC} - 3)$ grado de libertad, se acepta que el método es exacto con un valor de P mayor del 5% a un nivel de confianza del 95%.

5.7.2. Aplicación del método a la determinación de MOR en productos agrícolas (verduras).

El método propuesto ha sido aplicado a la determinación de MOR en tres productos agrícolas en cuyo cultivo está recomendado, en caso de ser necesario, el uso de MOR. Estos cultivos son: pepino, patata y judía verde. En ninguno de los casos se detectó la presencia de MOR mediante la aplicación de la calibración establecida con patrones externos, por lo que procedimos a comprobar la validez del método mediante un estudio de recuperación en muestras de este tipo que habían sido reforzadas previamente con el analito.

5.7.2.1. Determinación de MOR en pepinos:

De 100 g de pepino picado (con cáscara) se tomaron muestras de tres tamaños distintos, 5, 10 y 20 g. Dichas muestras se introdujeron en una serie de vasos de precipitado y se le añadieron cantidades de MOR a tres niveles de concentración diferentes: 0,25, 0,50 y 1,00 mg.kg⁻¹. Se introdujeron los vasos en un baño de ultrasonidos durante tres minutos, hasta que las muestras quedaron homogeneizadas, y se le añadieron a cada una de ellas 40 mL de acetonitrilo, se agitaron durante 2 minutos a 700 r.p.m, y se filtró a vacío a través de una membrana Millipore de 0,45 µm de tamaño de poro, cada una de ellas. La pulpa resultante se pasó de nuevo al mismo vaso y se pusieron otros 40 mL de acetonitrilo repitiéndose el pro-

ceso. A continuación se añadieron otros 25 mL de acetonitrilo sobre la pulpa de pepino, se filtró otra vez a vacío y el filtrado se transfirió a matraz esférico de 250 mL donde se eliminó totalmente el disolvente en un rotavapor. El residuo sólido se disolvió con 3 mL de etanol absoluto, se transfirió a un matraz aforado de 50 mL y se enrasó con una mezcla de agua/etanol (90/10 v/v).

Tabla 5.29. Estudio de recuperación de MOR en muestras de pepino.

Pepino					
Tamaño de muestra (g)	C añadida mg.Kg ⁻¹	C encontrada mg.Kg ⁻¹ (m)	R(m)(%)	(S _{n-1})	DNR%
5	1,00	0,977	97,7	(3,13)	3,2
	0,50	0,485	97,0	(3,00)	3,1
	0,25	0,244	97,6	(3,82)	3,9
10	1,00	0,969	96,9	(3,72)	3,8
	0,50	0,492	98,3	(3,00)	3,0
	0,25	0,249	99,6	(4,61)	4,6
20	1,00	0,985	98,5	(3,16)	3,2
	0,50	0,492	98,5	(3,04)	3,1
	0,25	0,248	99,2	(3,30)	3,3

Con cada una de estas disoluciones se prepararon las muestras para análisis siguiendo el método operatorio conocido. Los resultados obtenidos se reflejan en la tabla 5.29.

Criterio de validación de Doerffel aplicado a las muestras de pepino.

Tras los cálculos correspondientes, se obtuvieron los resultados recogidas en la tabla 5.30. Con los datos de esta tabla se concluye que no hay diferencia significativa entre los resultados obtenidos para distintos tamaños de muestra ya que en todos los casos obtenemos recuperaciones medias no significativamente distintas del 100 %, puesto que el valor de t calculado es inferior al valor de t tabulado para un nivel de confianza del 95%.

Tabla 5.30. Comprobación de la validez del método en muestras de pepino.

Tamaño de muestra (g)	Parámetros	Valores calculados
5	\bar{R}	97,47
	S_R	2,76
	t_{cal}	2,25 ($t_{tab} = 2,571$)
	P	7,43
10	\bar{R}	97,57 %
	S_R	3,12
	t_{cal}	1,91 ($t_{tab} = 2,571$)
	P	11,44
20	\bar{R}	98,50
	S_R	2,77
	t_{cal}	1,33 ($t_{tab} = 2,571$)
	P	24,1

Por lo tanto el método propuesto es aplicable a la determinación de MOR en pepino con un límite de detección, $LD = 0,0062 \text{ mg.Kg}^{-1}$ y de determinación de $LQ = 0,021 \text{ mg.Kg}^{-1}$.

5.7.2.2. Patata y judía verde

Aplicando el mismo procedimiento anterior para un tamaño de muestra de 10g se obtienen los resultados de la tabla 5.31.

Tabla 5.31. Estudio de recuperación de MOR en patatas y judía verde.

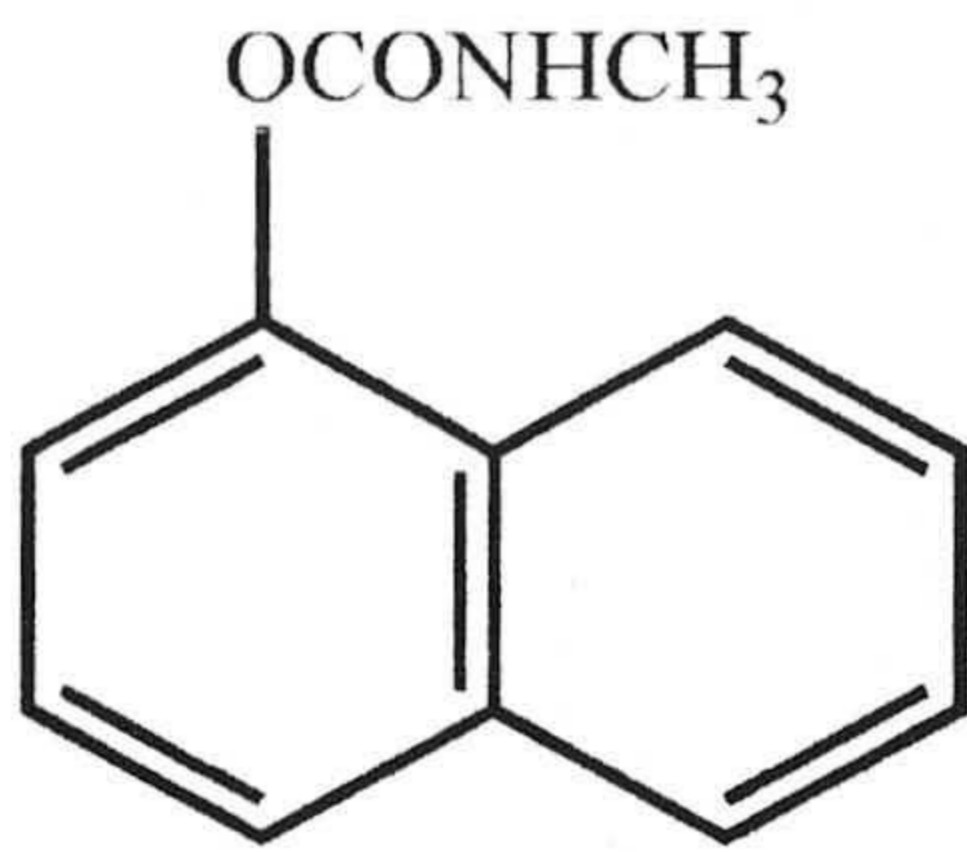
Patata				
Concentración añadida mg.Kg^{-1}	Concentración encontrado $\text{mg.Kg}^{-1}(\text{m})$	R(m)(%)	S_{n-1}	DNR%
1	0,946	94,6	(3,9)	4,10
0,50	0,495	99,1	(3,8)	3,81
0,25	0,251	100,5	(1,6)	1,60
Judía verde				
1	0,960	96,0	(1,0)	1,04
0,50	0,497	99,3	(4,2)	4,19
0,25	0,250	100,0	(4,0)	4,00

Se concluye que el método propuesto para la determinación de morestan y se utiliza una metodología sencilla no necesitando átomo pesado ni atmósfera inerte para la medida, ofrece resultados suficientemente exactos y buena precisión.

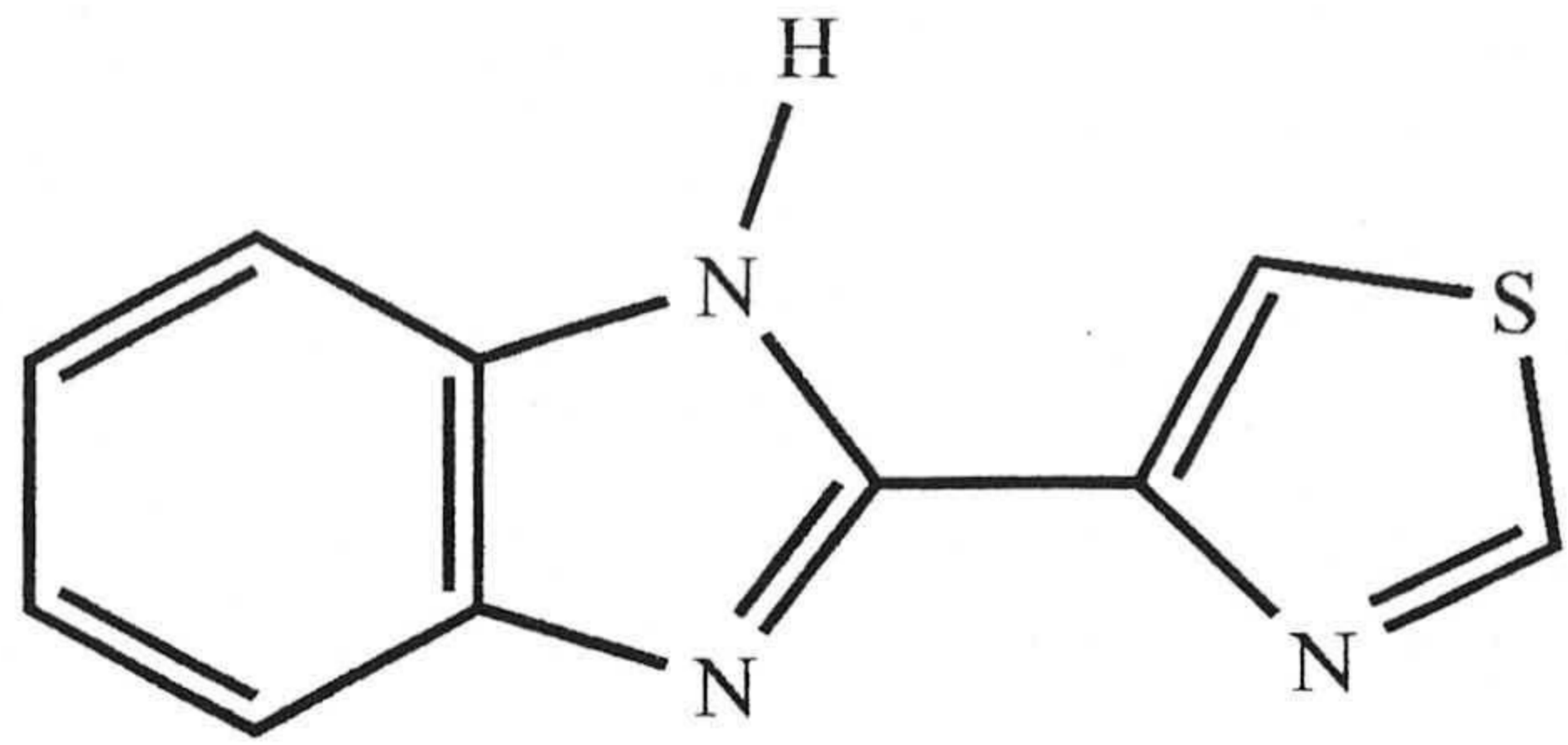
Como resultado de los estudios realizados se ha publicado un artículo denominado: *Determination of Morestan Residues in Water and Foodstuffs by Transmitted Room - Temperature Solid-Phase spectrophosphorimetry* por L. F. Capitán-Vallvey, M. K. Deheid, and R. Avidad, en la revista *Analytical Letters* 31(15), 2767-2789 (1998), del que hemos incluido una copia en el Apéndice nº 4 de esta Memoria

Bibliografía

1. J. J. Vanelli y E. M. Schulman, *Anal. Chem.*, 56, 1030, (1984).
2. F. Erewé y H. Kaspers, *Pflanzenschutz - Nachrichten.*, 18, 1 (1965).



CARBARIL



TIABENDAZOL

CAPÍTULO 6

**ESTUDIO DEL SISTEMA CARBARIL-TIABENDAZOL POR
ESPECTROFOSFORIMETRÍA EN FASE SÓLIDA USANDO
CALIBRACIÓN MULTIVARIANTE**

ÍNDICE DEL CAPÍTULO

6.1	OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES EXPERIMENTALES	300
6.1.1.	Optimización de variables experimentales de la muestra.	301
6.1.1.1.	<i>Elección del soporte sólido.</i>	301
6.1.1.2.	<i>Selección del metal pesado</i>	301
6.1.1.3.	<i>Influencia del uso de láminas de cuarzo y atmósfera de N₂</i>	302
6.1.1.4.	<i>Influencia del pH</i>	304
6.1.1.5.	<i>Influencia del volumen de muestra</i>	305
6.1.1.6.	<i>La influencia del tiempo de secado</i>	305
6.2	PROCEDIMIENTO OPERATORIO	307
6.2.1.	Optimización de la matriz de calibración	307
6.2.2.	Determinación de ambos pesticidas en una mezcla sintética aplicando el modelo PLS-1.	309
6.3	APLICACIÓN DEL MÉTODO PLS-1 A LA RESOLUCIÓN DE LA MEZCLA CBL Y TBZ EN MUESTRAS REALES DE AGUA DE DISTINTAS PROCEDENCIA.	311
6.4	VALIDACIÓN DEL MÉTODO PROPUESTO MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR)	312
	BIBLIOGRAFÍA	313

En los capítulos 2 y 3 de esta Memoria se han estudiado individualmente los pesticidas tiabendazol y carbaril mediante espectrofotometría en fase sólida utilizando en ambos casos papel de filtro W4 como soporte sólido. Debido a que ambos pesticidas presentan características fosforescentes muy parecidas, existe un gran solapamiento espectral que puede llegar a impedir la determinación conjunta de ambos analitos (Figura 6.1). Para solucionar el problema se intentó en primer lugar resolver dicha mezcla utilizando como señal analítica la señal derivada (1° y 2°) de la intensidad de fosforescencia así como la derivada del espectro sincrónico, utilizando el procedimiento de *zero-crossing*.

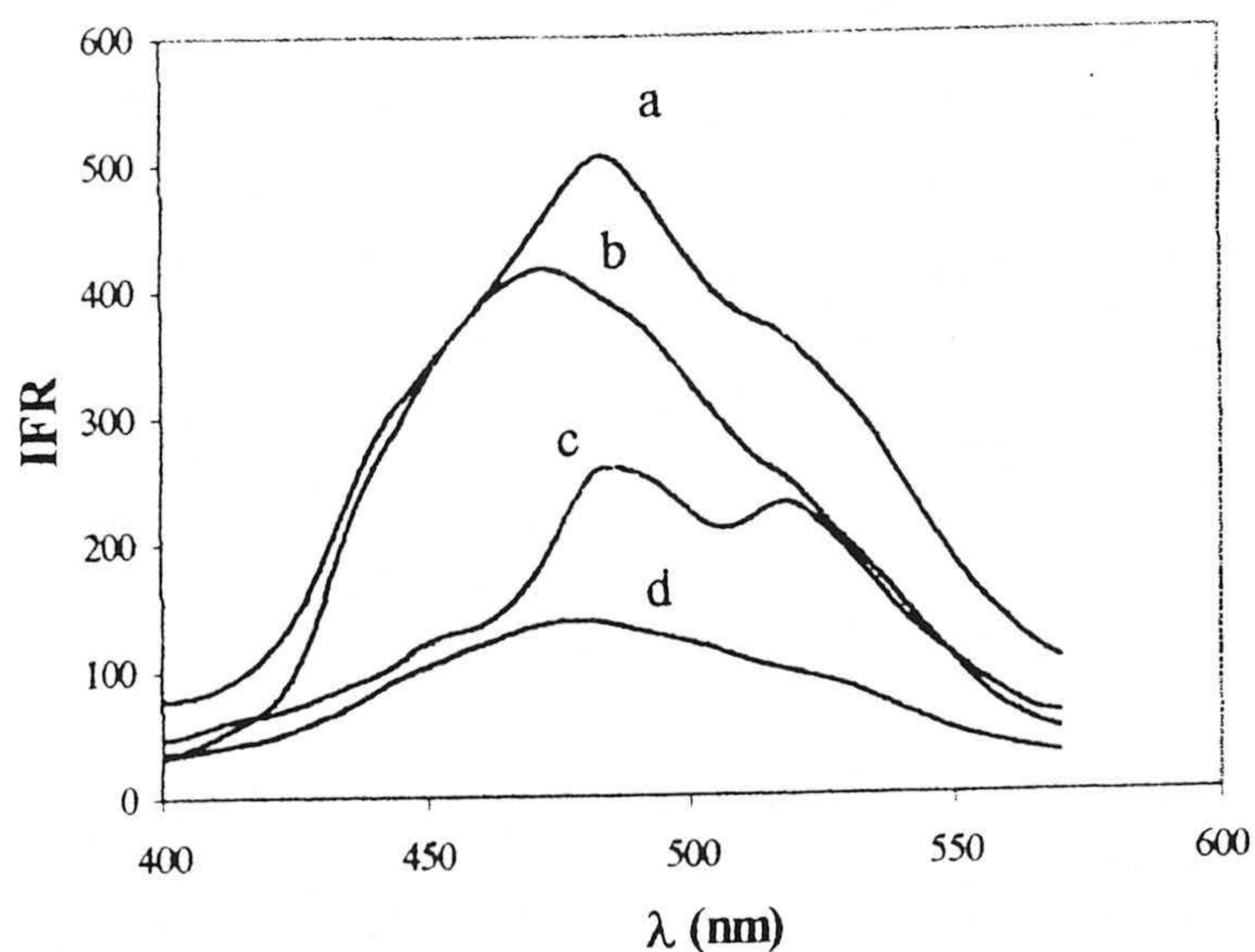


Figura 6.1: Espectros de a) emisión de la mezcla b) de emisión de TBZ c) emisión del CBL. d) emisión del blanco

En ningún caso se consiguió el resultado apetecido dada la falta de aditividad en las señales analíticas de ambos compuestos. Por ello se pensó en utilizar un método de calibración multivariante que tuviera como característica la flexibilidad, con objeto de soslayar el problema suscitado. El método elegido fue el conocido como calibración mediante mínimos cuadrados parciales en su modalidad PLS-1 que se describió en el capítulo 1 de esa Memoria.

Con ello se pretende probar la aplicabilidad del método de calibración multivariante a la determinación conjuntamente de dos analitos mediante espectrofosforimetría en fase sólida.

6.1. OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES EXPERIMENTALES

Puesto que vamos a utilizar la calibración multivariante en la que, como es sabido, se utilizan múltiples señales de los espectros, la optimización de variables experimentales queda limitada a la optimización de las variables que afectan a la preparación de la muestra. Para ello, como los máximos de los espectros de excitación son 303 nm para TBZ y 282 nm para el CBL. Con objeto de optimizar la longitud de onda de excitación de ambos, se registró el espectro de excitación de una muestra preparada a partir de una disolución que contenía $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de cada analito, observándose que dicho espectro presenta un máximo de excitación a 295 nm para una λ_{em} de 473 nm siendo las rendijas 2,5/5 nm y los tiempos de lectura de detector y de retraso en la apertura 12 ms y 0,1 ms respectivamente.

Posteriormente se comprobó que para este máximo de excitación los valores óptimos de t_d y t_g y de las rendijas eran los que hemos indicado anteriormente, por lo que las variables instrumentales que utilizaremos para optimizar las variables de la muestra así como para registrar los espectros que utilizaremos en la calibra-

ción con PLS-1 son las siguientes: $\lambda_{exc} = 295$ nm, $\lambda_{em} = 473$, $t_d = 0,1$ ms, $t_g = 12$ ms; rendijas de excitación y emisión, 2,5/5 nm respectivamente y velocidad de barrido = 240 nm/min.

6.1.1. Optimización de variables experimentales de la muestra.

Con los valores de las variables instrumentales mencionados se procedió la optimización de las siguientes variables de la muestra.

6.1.1.1. Elección del soporte sólido.

Como soporte sólido hemos elegido Whatman N° 4 ya que es este el soporte sólido en el que ambos analitos producen la emisión fosforescente mas adecuada.

6.2.1.2. Selección del metal pesado

En los capítulos 2, 3 hemos ensayado distintos átomos pesados, TI(I), Pb(II), Ag (I), Hg(II), yoduro, bromuro y cloruro como especies que pueden exaltar la emisión de fosforescencia, resultando que el acetato de plomo para el tiabendazol y el acetato de plomo y el nitrato de talio para el carbaril son las que producen un mayor efecto. Como consecuencia, hemos elegido el acetato de plomo para tal fin. A continuación y para optimizar el volumen de disolución de Pb(II) se prepararon disoluciones que contenían $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de cada analito (TBZ y CBL) y se añadieron cantidades crecientes de disolución saturada de acetato de plomo, preparándose con ellas las respectivas muestras que fueron medidas frente a sus correspondientes blancos.

Los resultados obtenidos a partir de estas experiencias correspondientes a tres replicas en cada uno de los casos se resumen en la tabla 6.1 y se representan en la figura 6.2.

Figura 6.2. Influencia del volumen de disolución de metal pesado.

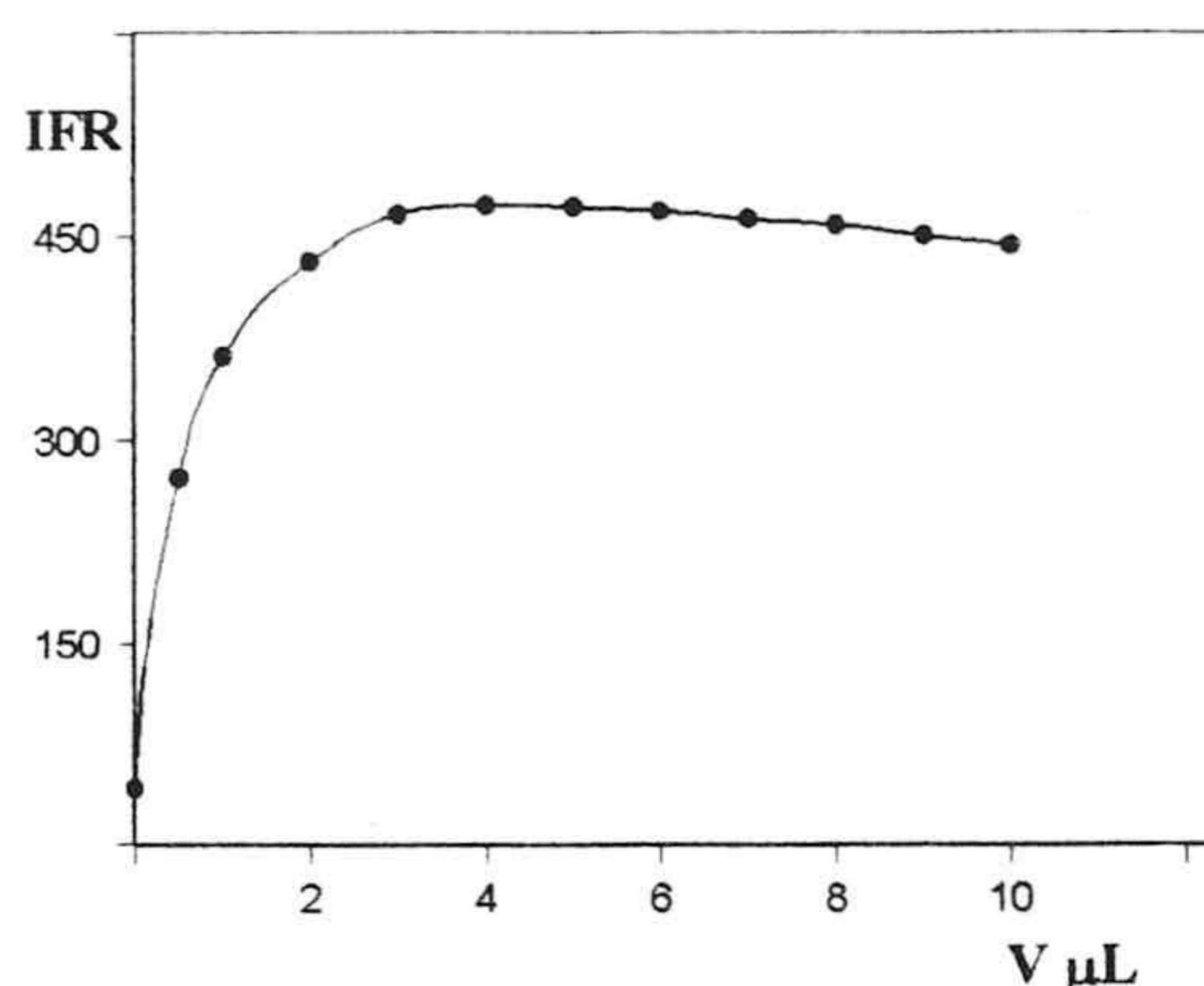


Tabla 6.1.

V (μL)	IFR	DNR %	V (μL)	IFR	DNR %
0,0	41,30	4,2	5,0	468,0	2,9
0,5	321,6	3,5	6,0	462,5	1,6
1,0	361,3	3,0	7,0	458,6	2,1
2,0	425,6	2,7	8,0	450,1	2,6
3,0	472,4	2,1	9,0	446,3	2,3
4,0	471,1	2,6	10,0	439,5	1,9

Como se aprecia en la figura 6.2 un volumen de 3,0 μL de disolución de Pb(II) son suficiente para producir la máxima intensidad de fosforescencia.

6.1.1.3. Influencia del uso de láminas de cuarzo y atmósfera de N₂

El efecto de *quenching* producido por la presencia del oxígeno y la humedad atmosférica, fue estudiado utilizando cuatro muestras cada una de las cuales contenía 1,0 μg.mL⁻¹ de cada analito. La intensidad de fosforescencia se midió durante un intervalo de tiempo comprendido, entre 1 y 30 min desde la preparación de la muestra. Estas muestras se midieron con y sin las láminas de cuarzo y en presencia y ausencia de corriente de nitrógeno seco. De los resultados obtenidos en este experimento podemos concluir que en las muestras en las que se utilizaron láminas de cuarzo durante su medida, la intensidad fosforescente es mayor que la de

las muestras donde no se utilizó. Por lo tanto si se mide la intensidad de fosforescencia durante los primeros 8 minutos después la preparación de la muestra, no hace falta la utilización de corriente de nitrógeno; simplificandose de esta manera el procedimiento operatorio.

Los resultados obtenidos en esta experiencia se resumen en la tabla 6.2 y se representan en la figura 6.3.

Tabla 6.2.

T(min)	IFR CSN	IFR CCN	IFR SCN	IFR SSN
0	465	472	263	230
2	476	478	274	225
4	476	479	278	215
6	471	479	283	205
8	468	481	282	185
10	464	479	282	182
12	460	477	282	187
14	456	475	279	180
16	450	473	279	175
18	440	471	276	160
20	424	470	275	165
22	460	470	275	162
24	446	470	272	157
26	435	468	271	152
28	431	467	270	147
30	415	463	268	141

*CCN: Con laminas de cuarzo y corriente de nitrógeno.

*CSN: Con laminas de cuarzo y sin corriente de nitrógeno.

*SCN: Sin laminas de cuarzo y con corriente de nitrógeno.

*SSN: Sin laminas de cuarzo ni corriente de nitrógeno.

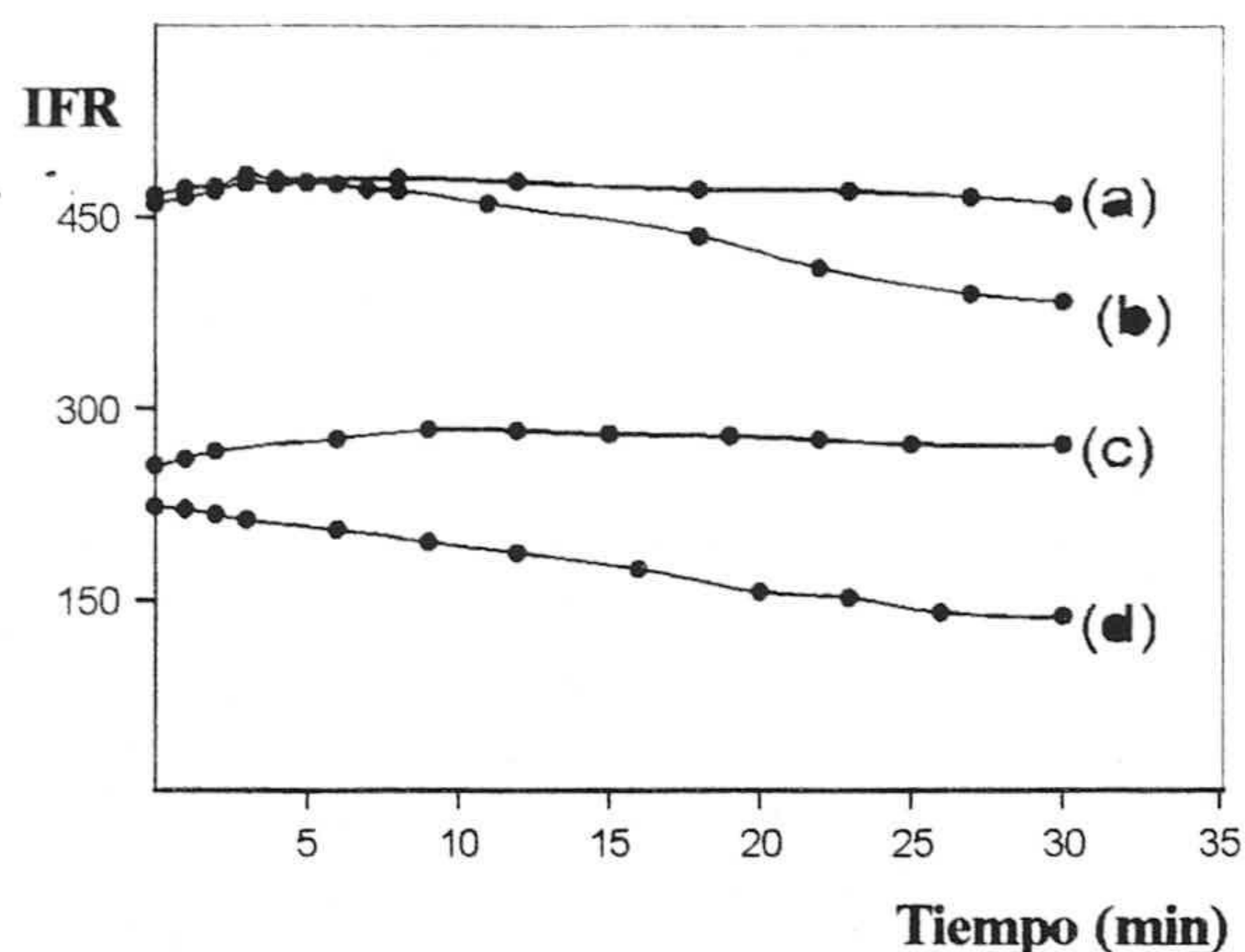


Figura. 6.3. Intensidad de fosforescencia relativa. (a) Con láminas y con N₂. (b) Con láminas de cuarzo sin N₂. (c) Sin láminas con N₂. (d) Sin láminas ni N₂.

6.1.1.4. Influencia del pH

La influencia del pH ya ha sido estudiado en los capítulos anteriores para ambos analitos individualmente.

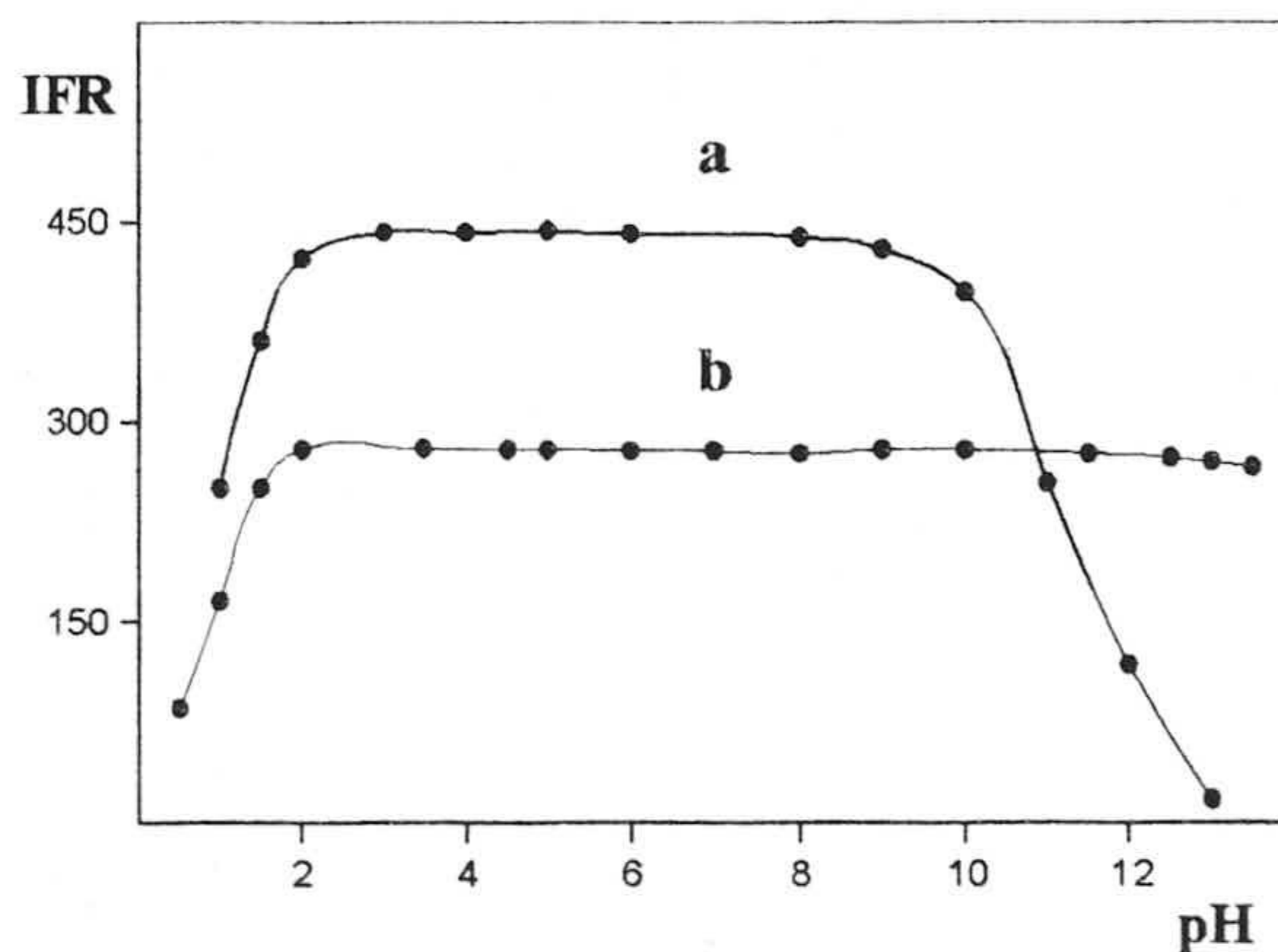


Figura 6.4. Influencia del pH sobre la IFR de la mezcla carbaril (a)- tiabendazol (b).

Como se resume en la figura 6.4, el tiabendazol presenta una señal fosforescente prácticamente independiente del pH del medio hasta llegar a valores muy

ácidos, y en el caso del carbaril podemos decir que desde pH 10 hasta 1,5 la intensidad de fosforescencia tampoco cambia.

Por lo tanto en el caso de la mezcla, al no variar la señal de fosforescencia transmitida en un amplio rango de pH para los dos analitos, podríamos trabajar a cualquier valor de pH comprendido entre 2,0 y 9,0. Sin embargo, se prefirió utilizar una disolución reguladora de $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COO}^-$ (1 M) pH = 4,08, porque además de asegurar que en muestras reales el pH está controlado nos sirve para aumentar levemente la intensidad de fosforescencia relativa de la mezcla. La causa de este aumento pudiera ser debida a la contribución del acetato a la rigidez molecular de los analitos y a su fijación en el soporte sólido.

6.1.1.5. Influencia del volumen de muestra

Para estudiar esta influencia se realizó la siguiente experiencia: se prepararon distintas muestras, aumentando el volumen de disolución de la mezcla depositado sobre el papel desde 0,5 hasta 5 μL . La disolución contenía $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de cada analito. De los resultados obtenidos de esta experiencia se concluyó que la intensidad de fosforescencia relativa aumenta al aumentar el volumen de muestra depositado dentro del intervalo 0,5-3 μL mientras que por encima de 4 μL la intensidad fosforescente comienza disminuir. Como consecuencia se eligió 3 μL de muestra como volumen de trabajo en posteriores experiencias.

6.1.1.6. La influencia del tiempo de secado

Para estudiar la influencia del tiempo de secado se utilizó un secador de pelo como en capítulos anteriores y siguiendo el mismo proceso se midió la intensidad de fosforescencia para diferentes tiempos de secado. Los resultados obteni-

dos para tres réplicas independientes de cada una de las muestras se resumen en la tabla-6.3 y se representan en la figura 6.5

Figura 6.5. Influencia del tiempo de secado

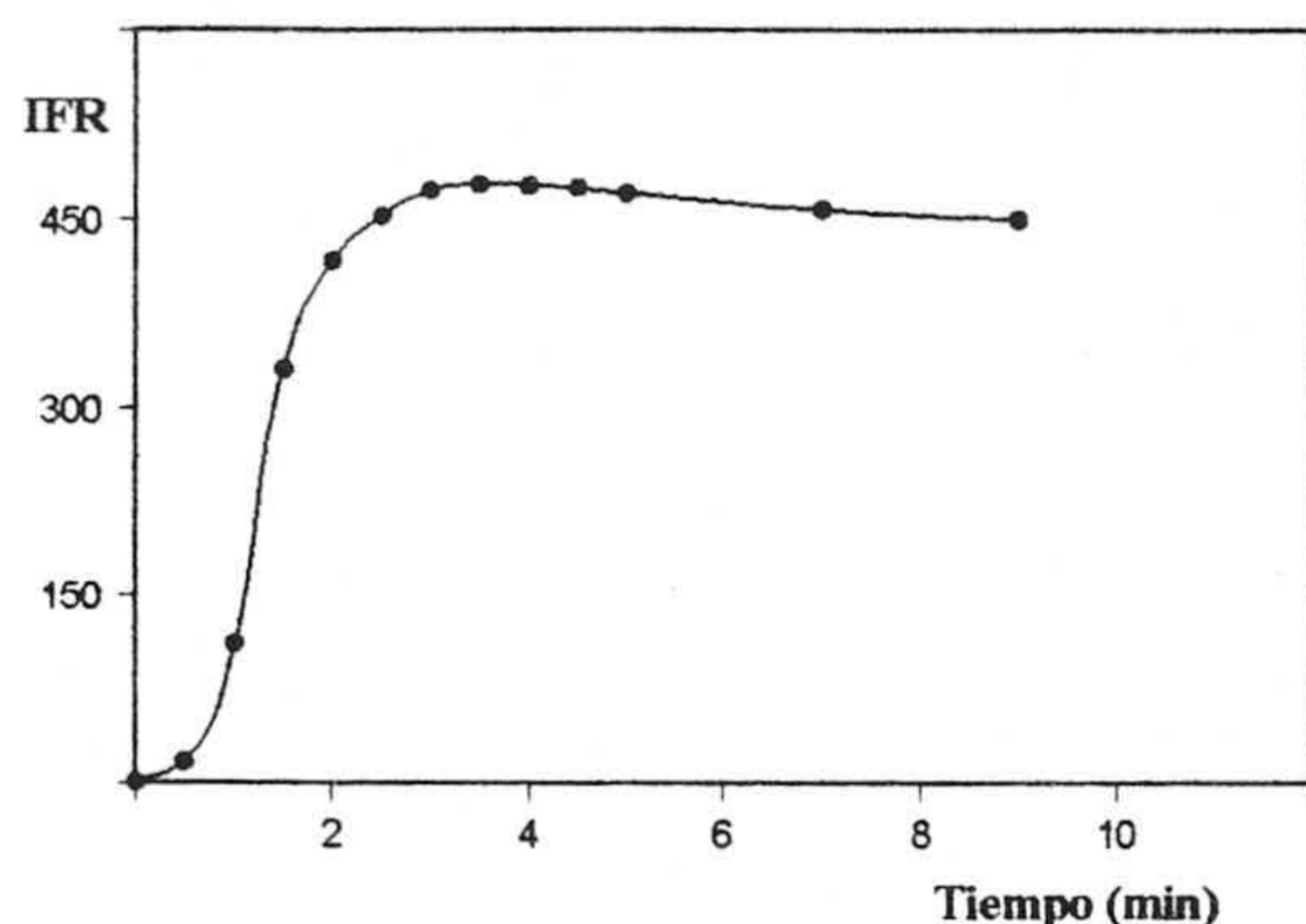


Tabla 6.3.

T (min)	IFR	DNR %	T (min)	IFR	DNR %
0,0	1,30	5,1	3,5	478	1,9
0,5	17,7	4,3	4,0	477	2,0
1,0	110,9	3,3	4,5	475	2,5
1,5	332,3	2,7	5,0	471	1,4
2,0	417,4	2,5	7,0	458	2,4
2,5	453,3	2,4	9,0	450	1,8
3,0	473,3	2,1			

Como resultado de todas estas experiencias se obtuvieron los valores óptimos de las variables experimentales que figuran en la tabla 6.4

Tabla .6.4 Valores óptimos de las variables experimentales.

Variables	Valor óptimo	Variables	Valor óptimo
Soporte sólido	Papel de W ₄	λ_{exc}	295 nm
Metal pesado	Pb(II)	λ_{em}	486 nm
[Pb(II)]	1,1M (saturado)	R _{ex}	2,5 nm
pH	4,08	R _{em}	5 nm
Volumen de la muestra	3 μ L	t _d	0,1 ms
Volumen Pb(II)	2,5 μ L	t _g	12 ms
Tiempo de secado	3 min	Ángulo de incidencia	45°
Tipo de secado	corriente de aire caliente		

6.2. PROCEDIMIENTO OPERATORIO

6.2.1. Optimización de la matriz de calibración

Para aplicar el método de calibración multivariante PLS-1, el primer paso es el establecimiento de la matriz de calibración. Con este fin se diseñó una matriz de calibración para la que se utilizaron 12 disoluciones de mezclas de ambos pesticidas, a concentraciones seleccionadas de forma aleatoria e incluidas dentro de los intervalos de linealidad establecidos para cada uno de los pesticidas por separado, es decir, entre 0,10 y 4,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Este número de muestras es lo suficientemente amplio para que al aplicar los criterios de rechazo y eliminar las posibles muestras erróneas, podamos disponer de un número adecuado de ellas que permita obtener la matriz de calibración óptima al aplicar el algoritmo. Para obtener cada una de estas muestras se aplicó el procedimiento operatorio establecido anteriormente, utilizando las condiciones optimizadas para la mezcla de ambos pesticidas, y se registraron sus espectros de fosforescencia entre 400 nm y 570 nm.

Una vez obtenidos los espectros de fosforescencia transmitida, tras restar la señal correspondiente al blanco a cada una de las muestras que componen la matriz de calibración multivariante, se sometió cada uno de dichos espectros a distintos tratamientos antes de aplicar el método de regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS), con el fin de obtener los mejores resultados posibles.

Los tratamientos a los que se somete al conjunto de espectros son:

1. El primer conjunto de datos está formado por los espectros sin ningún tratamiento previo. Son los que obtienen directamente al introducir las muestras en el espectrofluorímetro y registrar los espectros con un intervalo de longitud de onda de lectura de 0,5 nm.

2. El segundo conjunto de datos está formado por los espectros anteriores, después de ser sometido a una operación de suavizado del ruido instrumental, con un intervalo de 15 puntos experimentales.
3. El tercer conjunto de datos lo constituyen los espectros derivados de primer orden, obtenidos a partir de los espectros originales.
4. El cuarto conjunto de datos espectrales es el formado por los espectros originales, manipulado mediando el programa informático Data Leader, de forma que todos los espectros originales comiencen con un valor cero de fosforescencia, con lo cual todos los espectros que forman la matriz de calibración parten del mismo punto.

A cada uno de estos cuatro conjuntos de datos espectrales se le aplicó por separado el algoritmo PLS-1 con objeto de ver cual de ellos proporciona mejores resultados. Para hacer los cálculos en todos los casos se seleccionó la zona del espectro de emisión de fosforescencia transmitida comprendida entre 400 y 600 nm, ya que esta zona es donde se encuentra la mayor información espectral correspondiente a los analitos. En estas condiciones el número total de puntos experimentales que tenemos en los espectros sin derivar y sin suavizar es de 401 puntos. Al efectuar los cálculos con los cuatro conjuntos de datos se comprueba que se obtienen los mejores resultados con los espectros originales sin ninguna manipulación, es decir sin derivar ni suavizar. Una vez aplicados los criterios de rechazo establecidos anteriormente en capítulo 1 de esta Memoria, se seleccionan 12 muestras para obtener la matriz de calibración que figura en la tabla 6.5.

Tabla 6.5. Datos de la matriz de calibración

Muestra	[CAB] $\mu\text{g. ml}^{-1}$	[TBZ] $\mu\text{g. ml}^{-1}$
1	0,0	0,5
2	0,0	1,1
3	3,5	0,0
4	1,0	0,0
5	2,2	0,7
6	3,8	0,3
7	0,8	1,0
8	2,8	0,8
9	1,4	0,2
10	1,9	0,6
11	3,1	0,4
12	0,4	0,5

Utilizando el programa informático Grams/286Software Package Versión 1.0 y la aplicación PLS Plus (Galactic Industries, Salem, MA, USA) y Data Leader Software Package (Beckman, Fullerton) y los datos de la matriz anterior se obtuvo la matriz de calibración cuyos parámetros estadísticos figuran en la tabla 6.6.

Tabla 6.6. Parámetros estadísticos de la matriz de calibración.

Pesticida	Nº de factores	RMSD ^a	R ² ^b
CBL	3	0,22713	0,96912
TBZ	3	0,028233	0,99315

a Desviación estándar media residual.

b Coeficiente de correlación o de detección.

Como vemos, los resultados obtenidos en la predicción de ambos analitos son satisfactorios, ya que la correlación entre las concentraciones verdaderas y las predichas por la matriz, expresadas como R², son próximos a la unidad.

6.2.2. Determinación de ambos pesticidas en una mezcla sintética aplicando el modelo PLS-1.

La matriz de calibración, anteriormente calculada se empleó para determinar ambos pesticidas en mezclas sintéticas. El objetivo de esta experiencia era de-

terminar la capacidad de la matriz de calibración para resolver no solo mezclas binarias, sino también sistemas unitarios que solamente contengan uno de los analitos para que posteriormente, podamos aplicar el método a muestras reales de aguas de distinta procedencia. Para llevar acabo este objetivo se prepararon disoluciones con mezclas binarias de ambos analitos y otras que solo contenían uno de los analitos y se les aplicó el proceso operatorio establecido anteriormente, introduciendo sus espectros de fosforescencia en la matriz de calibración.

Los resultados obtenidos de esta experiencia, se resumen en la tabla 6.7 donde se establece el tanto por ciento de recuperación para cada una de los casos.

Tabla 6.7. Mezclas sintéticas de CBL y TBZ

Mezclas	CBL		TBZ	
	C ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	%R	C ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	%R
1	0,00	nc	1,00	94,40
2	3,00	102,3	0,50	90,60
3	2,50	103,2	0,65	102,1
4	3,50	98,66	0,40	97,80
5	1,30	98,92	0,65	100,2
6	0,00	nc	0,40	99,00
7	1,70	94,10	0,00	nc
8	3,60	98,94	0,00	nc
9	2,20	101,03	0,50	95,60
10	1,60	93,94	0,35	99,70
11	1,30	99,23	0,42	104,05
12	2,70	102,8	0,90	100,2

En la anterior tabla se pone de manifiesto la capacidad de la matriz de calibrado para predecir el contenido de los analitos o analito en muestras sintéticas unitarias y mezclas binarias ya que el porcentaje de recuperación para CBL se encuentra entre 93,9 y 103,2% y para TBZ entre 90,6 y 104,0%, por lo que los resultados se consideran satisfactorios quedando manifiesta la capacidad de la matriz de calibrado seleccionada para resolver este tipo de mezclas.

6.3. Aplicación del método PLS-1 a la resolución de la mezcla CBL y TBZ en muestras reales de agua de distinta procedencia.

Para llevar a cabo la aplicación del método a muestras reales de agua, se prepararon 12 muestras problemas de agua de distinta procedencia: agua del río Genil (Granada), agua de grifo (ciudad de Granada), agua mineral de Lanjarón (Granada) y agua mineral Font Vella (Gerona) a los que se les añadieron cantidades variables de TBZ y CBL, dado que no contenían ninguno de los pesticidas.

Se prepararon tres muestras diferentes en cada caso con concentraciones diferentes y se les aplicó el método operatorio establecido, realizándose tres réplicas para cada muestra. Los espectros de fosforescencia transmitida relativa de las muestras se introdujeron en la matriz de calibración seleccionada y se obtuvieron los resultados que se resumen en la tabla 6.8.

Tabla 6.8. Recuperación de CBL y TBZ en muestras de agua aplicando el modelo PLS-1.

Tipo de agua	Mezcla		% R	
	[CBL] $\mu\text{g.ml}^{-1}$	[TBZ] $\mu\text{g.ml}^{-1}$	CBL	TBZ
Agua de grifo (Granada)	0,00	1,00	(0,01)	93,3
	3,00	0,50	105,0	90,0
	2,50	0,60	105,6	105,0
Agua de Río Genil (Granada)	3,50	0,40	97,4	100,0
	1,00	0,60	101,0	98,3
	0,00	0,40	(0,02)	97,5
Agua de Lanjarón (Granada)	1,00	0,40	101,0	97,5
	3,80	0,00	93,4	(0,02)
	2,00	0,50	98,5	96,0
Agua de Font Vella (Gerona)	1,50	0,30	94,0	100,0
	1,80	0,00	95,6	(0,04)
	2,50	0,85	96,4	102,4

*Los valores que están entre paréntesis son los medidas mediante el método PLS-1 en la ausencia de este compuesto en la mezcla.

*nc: no contiene

*Cada valor de la tabla se ha obtenido como resultado de tres replicas.

6.4. Validación del método propuesto mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR).

Con objeto de comprobar la exactitud y la validez de los resultados obtenidos mediante nuestro método de espectrofotometría transmitida a temperatura ambiente, se compararon con los obtenidos con el método por CLAR establecido por Dilna, Hall, Shamis y Whitlock usado como método de referencia.

Una vez obtenidos los resultados mediante nuestro método y mediante el de referencia CLAR procedimos a su comparación estadística. La comparación se hizo aplicando el método estadístico descrito en el Capítulo 1 de la presente Memoria.

Tabla 6.9. Recuperación TBZ y CBL mediante PLS-1 y CLAR en muestras de aguas reforzadas con uno o los dos componentes.

Nº m ^a	TBZ ^b puesto mg.L ⁻¹	PLS-1 mg.L ⁻¹	RSD (%)	CLAR mg.L ⁻¹	RSD (%)	P(%)	CBL ^b puesto mg.L ⁻¹	PLS-1 mg.L ⁻¹	RSD (%)	CLAR mg.L ⁻¹	RSD (%)	P(%)
1	0,00	(0,01)	1,00	0,93	3,1	0,96	4,5	18,4
2	3,00	3,15	2,0	3,10	3,0	27,4	0,50	0,45	4,7	0,47	3,2	8,0
3	2,50	2,64	2,5	2,59	3,4	21,1	0,60	0,63	2,9	0,60	4,9	8,7
4	3,50	3,41	2,3	3,48	3,4	24,2	0,40	0,40	2,9	0,41	3,9	19,0
5	1,00	1,09	3,2	1,08	4,6	64,0	0,40	0,59	2,5	0,61	5,3	29,5
6	0,00	(0,02)	0,60	0,39	4,1	0,40	3,1	16,1
7	1,00	1,01	3,5	0,98	5,1	20,8	0,40	0,39	4,8	0,41	2,7	32,0
8	3,80	3,55	6,0	3,60	4,1	60,2	0,00	(0,02)
9	2,00	1,97	7,1	2,00	4,5	64,8	0,50	0,48	5,5	0,49	3,7	41,8
10	1,50	1,41	3,4	1,44	4,1	20,4	0,30	0,30	3,1	0,32	5,2	6,6
11	1,80	1,72	4,6	1,75	5,2	31,2	0,00	(0,04)
12	2,50	2,41	1,9	2,44	2,4	23,2	0,85	0,87	2,0	0,86	3,9	32,0

^a Muestras 1-3: agua de grifo potable ciudad de Granada; muestras 4-6: agua del río Genil (Granada); muestras 7-9: agua mineral de Lanjarón (Granada); muestras 10 – 12: agua de Font Vella (Gerona). ^b Los valores que están entre paréntesis son los medidas del método propuesto cuando no está en la muestra el componente.

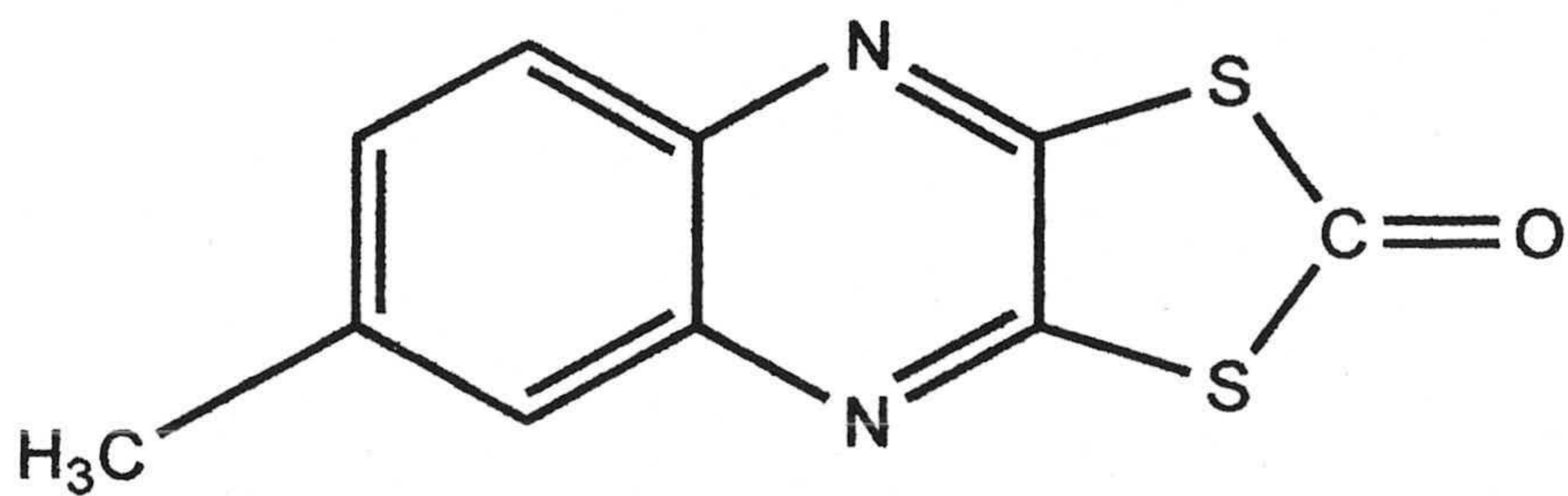
Los resultados obtenidos de la comparación estadística del contenido de los pesticidas en las muestras reales, junto con los parámetros estadísticos necesario para tal fin, se resumen en la tabla 6.9. Es de destacar que los resultados obtenidos por nuestro procedimiento son estadísticamente similares a los del método de referencia.

Como vemos de la comparación de los resultados se comprueba que los valores del estadístico test de Student t_{cal} es menor que el valor t_{tab} a un nivel de confianza del 95% para $(n_{Ref} + n_r - 2)$ grados de libertad, por tanto no hay diferencias significativas entre las medias de ambos conjuntos de datos de los dos métodos, por lo que el método aplicado es exacto.

Como resultado de los estudios realizados se ha publicado un artículo denominado: Application of Partial Least Squares Multivariate Calibration for the Determination of Mixture of Carbaril and Thiabendazole in Water by Solid-Phase espectral phosphorimetry por L. F. Capitán-Vallvey, Mahmoud. Kalil A. Deheid, I. De Orbe y R. Avidad, en la revista *Analyst*, 124, 49-53 (1999), del que hemos incluido una copia en el Apéndice nº 5 que figura de esta Memoria.

Bibliografía

V. Dilna, H. Rex, S. Jeff y S. A. Whitlock, *J. Chromatogr.* 283, 383 (1984)



CAPÍTULO 7

**DETERMINACIÓN DE MORESTAN MEDIANTE UN
SENSOR FOSFORIMÉTRICO DE UN SOLO USO**

ÍNDICE DEL CAPÍTULO

7.1	CARACTERÍSTICAS FOSFORESCENTES DEL MORESTAN	317
7.2	OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES EXPERIMENTALES	319
7.2.1	Preparación del sensor.	320
7.2.1.1.	<i>Selección de los constituyentes de la zona sensora.</i>	320
7.2.1.1.1	<i>Influencia de la cantidad de PVC</i>	321
7.2.1.1.2	<i>Influencia de la cantidad de tetrahidrofurano</i>	322
7.2.1.1.3	<i>Influencia del tributilfosfato</i>	323
7.2.1.1.4	<i>Influencia del volumen de cocktail</i>	324
7.2.1.1.5	<i>Tiempo de secado de la membrana</i>	325
7.2.2	Variables que influyen en la interacción analito-sensor	326
7.2.2.1	<i>Influencia de átomo pesado</i>	326
7.2.2.2	<i>Forma de equilibración</i>	328
7.2.2.3	<i>Influencia del tiempo de agitación</i>	329
7.2.2.4	<i>Influencia del pH del medio</i>	329
7.2.2.5	<i>Influencia de la fuerza iónica</i>	331
7.2.2.6	<i>Influencia del secado tras la equilibración</i>	331
7.2.3	Variables instrumentales.	333
7.2.3.1	<i>Influencia de una corriente de nitrógeno seco.</i>	333
7.2.3.2	<i>Optimización las rendijas de excitación y de emisión.</i>	334
7.2.3.3	<i>Optimización de los tiempos del detector.</i>	334
7.2.3.4	<i>Influencia del ángulo de incidencia de la radiación.</i>	335
7.3	PROCEDIMIENTO OPERATORIO	339
7.4	ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE CONCENTRACIÓN Y SEÑAL ANALÍTICA	340
7.5	PARÁMETROS ANALÍTICOS	342
7.5.1	Función de calibrado	342
7.5.2	Linealidad	344
7.5.3	Sensibilidad	344
7.5.4	Límites de detección y cuantificación	344
7.5.5	Rango dinámico lineal	345
7.5.6	Precisión	345
7.6	ESTUDIO DE INTERFERENCIAS	347
7.7	APLICACIONES ANALÍTICAS	348
7.7.1	Determinación de MOR en aguas	348
7.7.1.1	<i>Aguas minerales, de río y potable</i>	348
7.7.1.2	<i>Agua de mar</i>	349
7.7.1.3	<i>Aplicación a aguas residuales</i>	355
	BIBLIGRAFÍA	367

En el presente capítulo se pretende el desarrollo de un sensor de un solo uso para la determinación del pesticida morestan. El objetivo es poner a punto un sensor que reduzca al mínimo el tratamiento de la muestra y que no necesite trabajar con disoluciones de reactivos de diversos tipos. Ello se consigue mediante el uso de tiras reactivas que contengan todos los componentes necesarios para originar una respuesta adecuada frente al analito en cuestión. Estos ensayos rápidos se pueden considerar elementos analíticos integrales dado que en su constitución llevan incorporados todos los componentes necesarios para separar o enmascarar interferentes, proporcionar el pH adecuado o provocar reacciones previas a la que finalmente nos generará la señal analítica.

Para utilizarlo la disolución que contiene el analito se pondrá en contacto con el sensor, bien por inmersión o por deposición de un pequeño volumen sobre él. La disolución o el analito penetra a través de él desarrollando una propiedad analítica que se mide con ayuda de un instrumento diseñado “*ad hoc*” o bien convencional.

De los diversos tipos de sensores luminiscentes existentes aquí nos basamos en una propiedad intrínseca del analito como es la fosforescencia. Así pues la acción sensora se basa en la extracción del analito a la microzona de la tira reactiva, permitiendo de esta manera la emisión fosforescente.

Se resume a continuación las diferentes experiencias llevadas a cabo para conseguir la puesta a punto del citado sensor.

7.1. CARACTERÍSTICAS FOSFORESCENTES DEL MORESTAN

Partiendo los resultados obtenidos anteriormente en el Capítulo 5 sobre las características fosforescentes del morestan, hemos establecido los espectros bidimen-

sionales de excitación y emisión del morestan en este tipo de sensor. Para ello, se operó como sigue: Para preparar la membrana se usó un cocktail que contiene 50 mg de cloruro de polivinilo, 0,5 mL de tributilfosfato y 1,8 mL de tetrahidrofurano. A continuación se depositaron 5 μL del cocktail sobre la superficie de una membrana de poliéster usado como soporte sólido, utilizando el accesorio diseñado por nosotros. A continuación se secó la membrana en un desecador bajo vacío, sobre cloruro de calcio anhidro. Para retener el analito: se introduce la membrana en una disolución de $0,2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de morestan y se agita durante dos horas. A continuación, se seca la membrana en un desecador a vacío sobre cloruro de calcio durante 20 min y se introduce en el compartimento de muestras del instrumento. Los espectros se registraron bajo las siguientes condiciones instrumentales: para el espectro de excitación la longitud de onda de emisión fue 520 nm, registrándose el espectro entre 330 nm y 390 nm de excitación y para el espectro de emisión, la longitud de onda de excitación fue 363 nm, registrándose el espectro entre 390 nm y 610 nm.

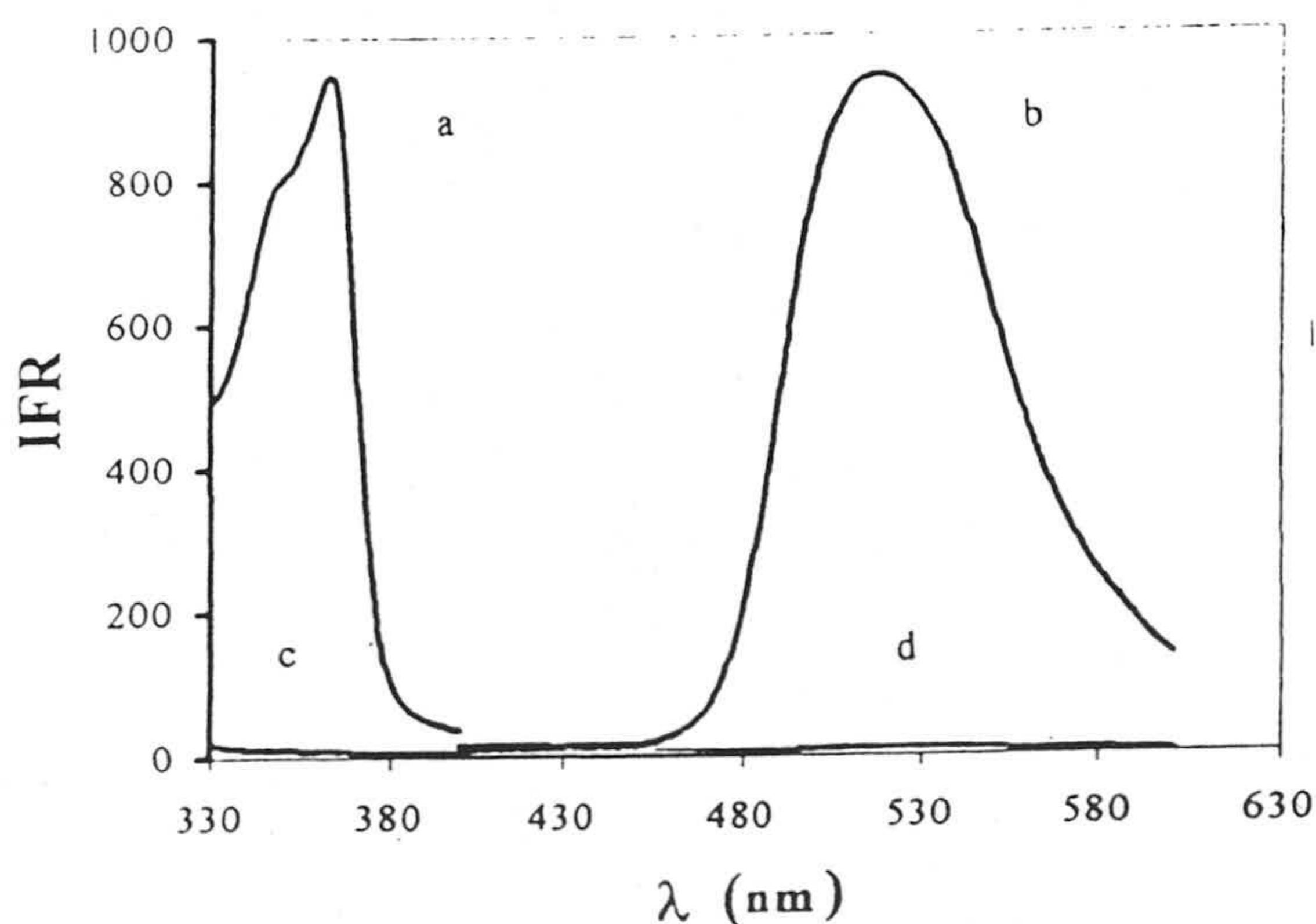


Figura 7.1. Espectros de excitación y emisión. Blanco (c,d) y muestra (a,b) del MOR en la membrana sensora.

En ambos casos $t_d = 0,15$ ms, $t_g = 10$ ms, rendijas de excitación y de emisión 5 y 10 nm respectivamente y velocidad de barrido = 240 nm.min⁻¹. Los espectros obtenidos los podemos observar en la figura 7.1.

7.2. OPTIMIZACIÓN DE LAS VARIABLES EXPERIMENTALES

La optimización de cada una de las variables, tanto del sensor como instrumentales, se llevó a cabo manteniendo constantes los valores de todas ellas, excepto el de aquella variable que se deseaba estudiar, estableciendo entonces su influencia sobre la intensidad de fosforescencia emitida por el analito. A través de una serie de experiencias previas se han establecido las variables experimentales influyentes. Estas variables se pueden clasificar en tres grupos.

- a) Variables de preparación del sensor: tipo del soporte sólido, tipo y composición de la mezcla (proporción del polímero, plastificante y disolvente), volumen de la mezcla usada para preparar el sensor, tiempo de secado y forma de efectuar el secado.
- b) Variables que influyen sobre la interacción del analito con el sensor: forma de equilibración, tiempo de agitación, velocidad de agitación, influencia del pH del medio y de la fuerza iónica, forma del secado de la membrana, tiempo del secado e influencia de un gas inerte y seco sobre la medida de fosforescencia.
- c) Variables instrumentales: anchura de rendijas de excitación y emisión, tiempo de lectura del detector (t_g), tiempo de retraso en la apertura (t_d) y ángulo incidencia de la radiación sobre la superficie de la membrana sensora.

7.2.1. Preparación del sensor

7.2.1.1. Selección de la membrana y de los constituyentes de la microzona sensora.

El sensor de un solo uso que se desea preparar es de los que emplean cloruro de polivinilo como matriz polimérica que sirve de soporte a los diferentes reactivos. A este tipo de membrana sensora es necesario adicionar un plastificante que actúa como disolvente, permitiendo la movilidad de las moléculas en ella.

La preparación del sensor se realiza por deposición de un volumen dado de una disolución que contiene el polímero, el plastificante y los reactivos. Esta disolución, a la que en adelante llamaremos cocktail, se deposita sobre un soporte inerte que tenga propiedades adecuadas y se deja secar, con lo que obtendremos una microzona de muy pequeño espesor (pocos μm) capaz de interaccionar con el analito. En nuestro caso, deseamos medir la fosforescencia como propiedad analítica y además medirla, como se ha hecho en capítulos precedentes de esta Memoria, por transmisión. En consecuencia, será necesario un soporte que sea transparente a la radiación usada y no emita un fondo apreciable.

De los diversos polímeros plásticos ensayados dispuestos en forma de láminas (poliester, acetato de polivinilo, metacrilato) el que mejor resultado ofreció fue el poliester tipo Mylar (politereftalato de etileno) que no emite fosforescencia, originando por ello valores de blancos muy bajos.

En cuanto a la composición de la membrana sensora solo serán necesarios el polímero matriz y el plastificante, pues la fijación del analito será por reparto y el propio analito muestra la propiedad analítica a medir. Por ello se probaron como polímeros matriz, cloruro de polivinilo, acetato de polivinilo y poliuretano y como plastificante (solo para el caso de cloruro de polivinilo y acetato de polivinilo),

fosfato de tributilo, ftalato de dioctilo, 2-nitrofeniloctileter, tris(2-etilhexil)fosfato y bis(2-etilhexil)sebacato. Como disolventes se ensayaron tetrahidrofurano y mezcla hidroalcoholica etanol/agua de diversas composiciones. Los mejores resultados se obtuvieron usando cloruro de polivinilo (PVC) como polímero, tributilfosfato (TBP) como plastificante tetrahidrofurano (THF) como disolvente.

A continuación se describen los resultados obtenidos en las experiencias realizadas para la optimización de la proporciones de estos constituyentes. En el capítulo 1 se describe la forma en que se preparan la membrana y los dispositivos para ello usados por ello aquí no se comentará este aspecto.

7.2.1.1.1 Influencia de la cantidad de PVC

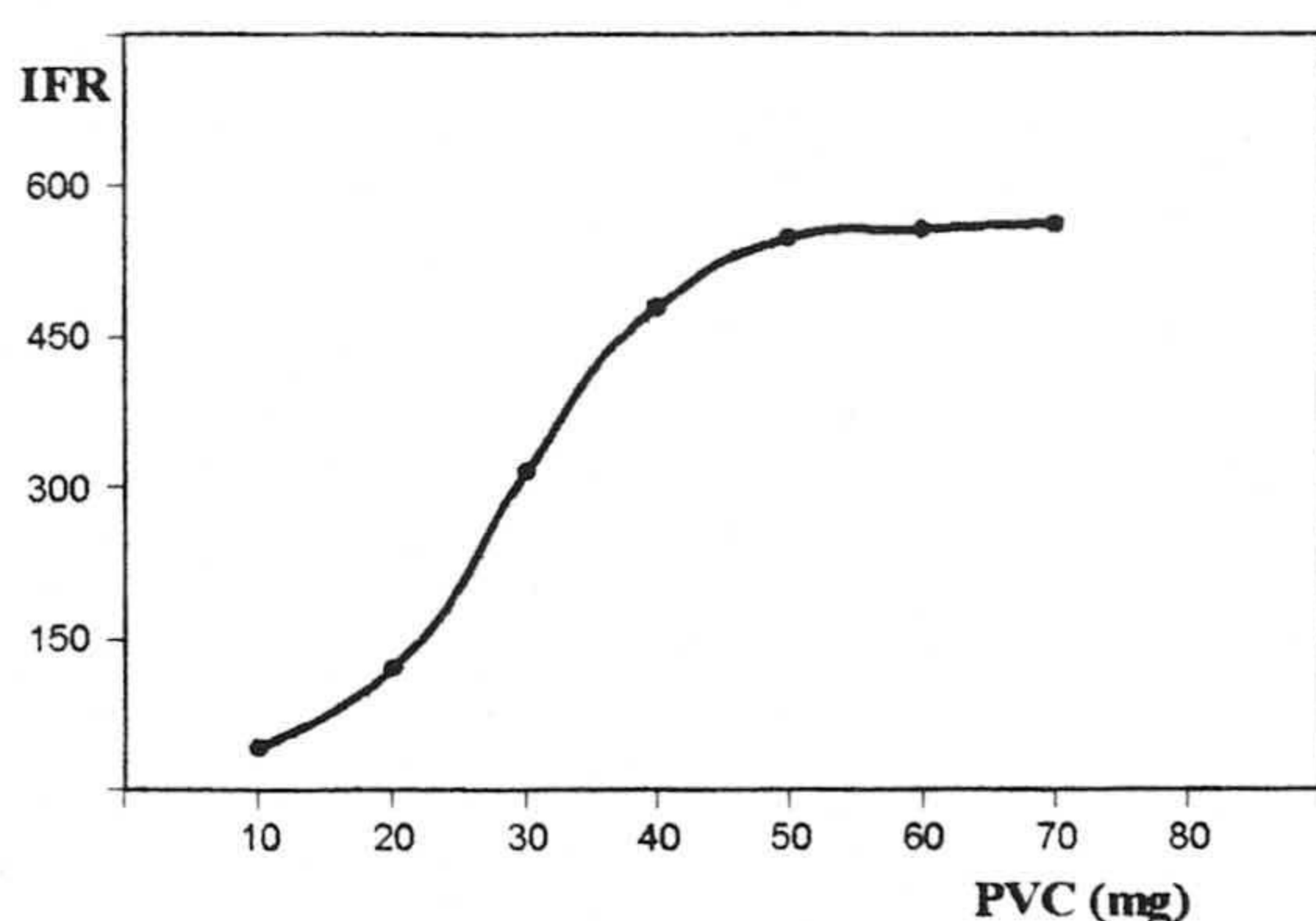
Para establecerla se realizo la siguiente experiencia: se prepararon siete viales de 5 cm³ de capacidad que contenían 60 mg de TBP, 0,6 mL de THF y cantidades variables de PVC en el rango entre 10 y 70 mg. Se agitaron los viales durante 2 minutos. De cada cocktail, se prepararon varias membranas depositando 5 µL en la superficie de una membrana de Mylar tal como se describe mas arriba. A continuación se secaron en un desecador a vacío durante 20 minutos y se sumergieron los sensores en disoluciones acuosas, las cuales contienen 0,2 µg.mL⁻¹ de morestan, utilizándose el procedimiento operatorio propuesto.

Se registraron los espectros de fosforescencia transmitida bajo unas condiciones experimentales de $t_g = 10$ ms y $t_d = 0,15$ ms, $\lambda_{exc} = 363$, nm $\lambda_{em} = 520$. Los resultados obtenidos se recogen en la tabla 7.1 y se representan en la figura 7.2.

Tabla 7.1.

PVC(mg)	IFR	DNR%
10	41,80	5,3
20	121,1	4,1
30	315,4	3,3
40	478,9	2,7
50	547,5	2,8
60	556,2	1,9
70	561,3	2,3

Figura 7.2



Un aumento en la cantidad de PVC supone un considerable incremento de la señal fosforescente. Se elige para posteriores experiencias 50 mg de PVC.

7.2.1.1.2. Influencia de la cantidad de tetrahidrofurano.

Con objeto de preparar una mezcla donde los componentes estén perfectamente disueltos y cuya concentración sea suficientemente alta para conseguir la mayor retención posible de MOR y la mayor reproducibilidad, se estudio la cantidad necesaria de disolvente THF. Para llevar a cabo este estudio, se prepararon diez cocktail con cantidades constantes de PVC (50 mg) y TBP (0,6 mL) y distintas cantidades de THF entre 0,5 y 4,5mL. A partir de estas mezclas se prepararon varios sensores de la manera anteriormente dicha. Utilizándose el procedimiento

operatorio propuesto se pusieron en contacto con disoluciones de morestan de $0,2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Se registraron los espectros de fosforescencia transmitida bajo las condiciones experimentales ya indicadas. Los resultados obtenidos se recogen en la tabla 7.2 y se representan en la figura 7.3.

Figura 7.3. la influencia del volumen de THF

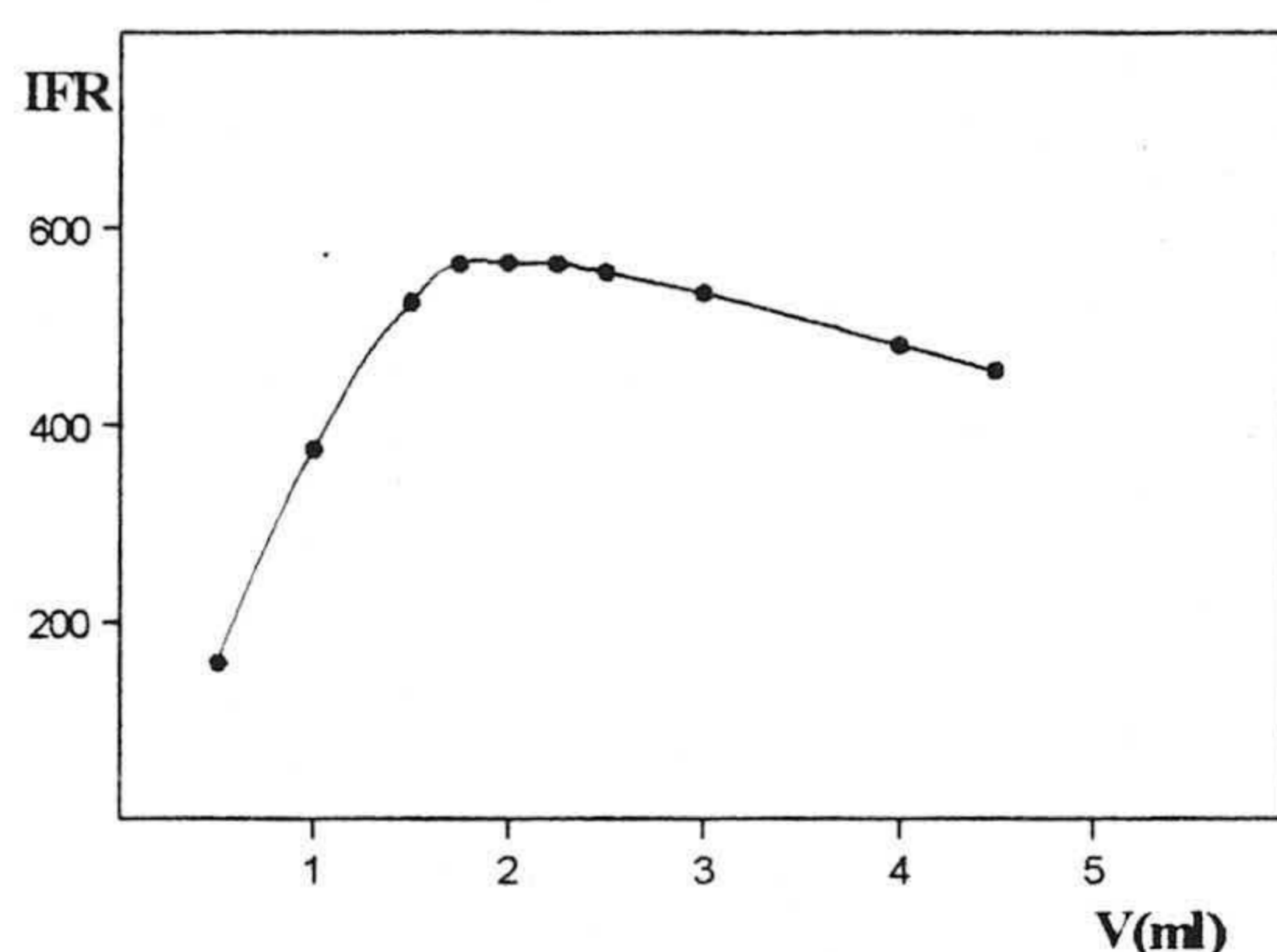


Tabla 7.2.

THF (mL)	IFR	DNR %
0,50	158,7	3,3
1,00	375,8	2,1
1,50	525,4	1,8
1,75	565,7	2,3
2,00	566,6	2,4
2,25	565,2	2,2
2,50	555,8	2,0
3,00	5356,0	2,5
4,00	482,1	3,1
4,50	454,9	2,1

Con los resultados obtenidos podemos ver que el uso de 1,8 mL de THF como disolvente es el más adecuado para producir los mejores resultados. Como consecuencia, para posteriores experiencias se usaron: 50 mg de PVC y 1,8 mL de THF como disolvente.

7.2.1.1.3. Influencia del tributilfosfato.

Para conocer la influencia que ejerce la cantidad de TBP sobre la intensidad de fosforescencia, se realizó la siguiente experiencia. Se prepararon una serie de diez cocktail con cantidades constantes de PVC (50 mg) y THF (1,8 mL) y distintas cantidades de TBP entre 0,1 y 1,0 mL. A partir de estas mezclas se prepararon

varios sensores de la manera descrita anteriormente, los cuales se utilizaron para el análisis de una disolución de MOR de $0,2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, utilizándose el procedimiento operatorio anterior.

Se registraron los espectros de fosforescencia transmitida bajo las mismas condiciones experimentales. Los resultados obtenidos se recogen en la tabla 7.3 y se representan en la figura 7.4.

Figura 7.4. La influencia de la cantidad de TBP.

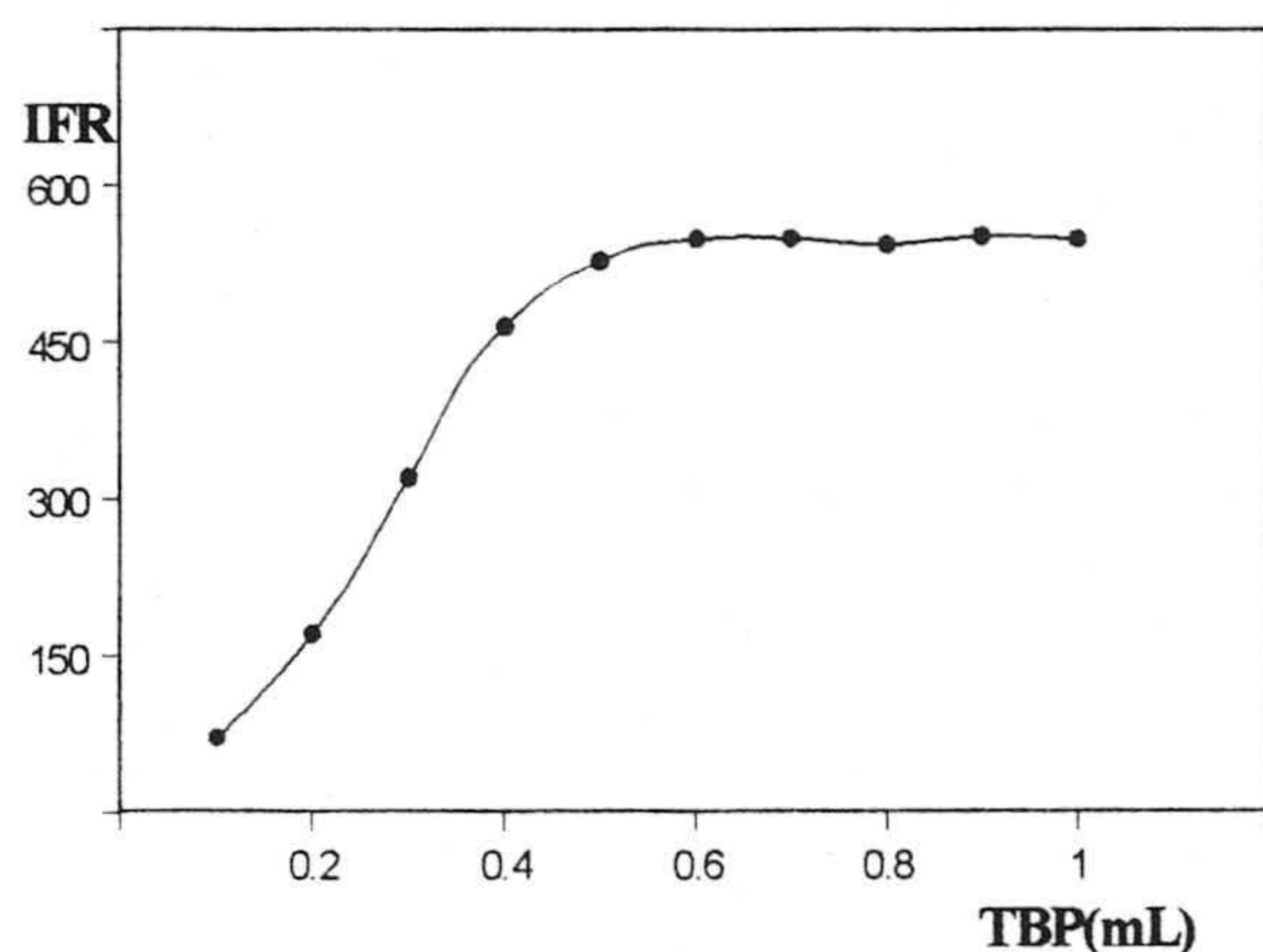


Tabla 7.3.

TBP(mL)	IFR	DNR%
0,1	70,4	4,7
0,2	170,9	5,1
0,3	320,5	3,0
0,4	463,8	2,4
0,5	526,3	1,9
0,6	546,6	2,5
0,7	550,6	1,7
0,8	547,8	2,0
0,9	555,1	2,6
1,0	549,5	1,6

La presencia de plastificante incrementa la señal fosforescente hasta 0,6 mL volumen que se elige para posteriores ocasiones.

7.2.1.1.4. Influencia del volumen de cocktail.

Uno de los parámetros experimentales que influyen en la intensidad de fosforescencia es el volumen de la gota de la disolución depositada sobre el soporte sólido. Para estudiar esta influencia se prepararon diferentes membranas usando las proporciones antes establecidas, aunque variando el volumen de la disolución entre 2,5 y 13,0 μL . Estos sensores se utilizaron para el análisis de una di-

solución de morestan de $0,2 \mu\text{g. mL}^{-1}$, usando el procedimiento operatorio antes indicado.

Se registraron los espectros de fosforescencia transmitida bajo las condiciones antes dichas. Los resultados obtenidos correspondientes a tres réplicas en cada uno de los casos se recogen en la tabla 7.4 y se representan en la figura 7.5.

Figura 7.5. La influencia de volumen de la gota de la membrana sobre la intensidad fosforescente de MOR.

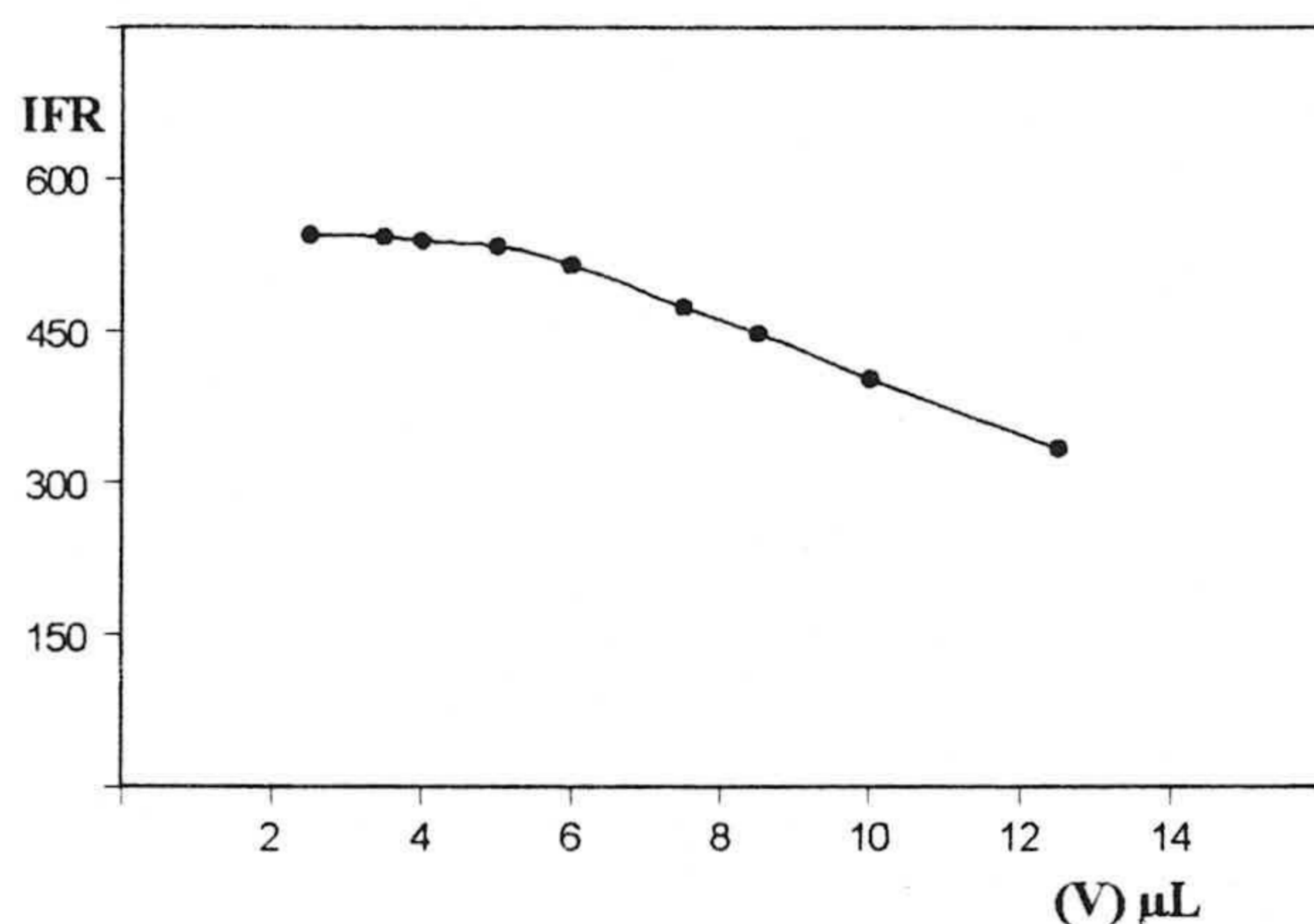


Tabla 7.4.

V(μL)	IF	DNR(%)
2,5	545,4	4,5
3,5	543,5	3,6
4,0	535,4	2,3
5,0	534,9	2,3
6,0	518,6	1,7
7,5	476,0	2,3
8,5	447,4	2,4
10	402,4	2,8
12	333,7	3,9

Un aumento del volumen de cocktail da lugar a un aumento del tamaño (del área) y del volumen de la microzona del sensor y ello supone una disminución de señal fosforescente. Ello es lógico pues supone aumentar el volumen de extractante y hacer que ocupe una zona mayor que la zona iluminada por la radiación, con lo que disminuirá la emisión fosforescente. Entre 1 y 5 μL no varia significativamente la señal, se eligió 5 μL como valor óptimo ya que la desviación estándar se reduce considerablemente.

7.2.1.1.5. Tiempo de secado de la membrana.

Uno de los factores que puede influir sobre la intensidad de fosforescencia, es el tiempo de secado de la membrana una vez depositado el volumen de cocktail

sobre el soporte sólido. Para saber la influencia que ejerce este parámetro se realizó una experiencia en la que se midió la fosforescencia transmitida de varias muestras secadas a vacío sobre cloruro de calcio anhidro, durante distintos periodos de tiempo de hasta 50 minutos, manteniendo constantes las restantes variables experimentales. Los datos obtenidos correspondientes a tres réplicas en cada uno de los casos se resumen en la tabla 7.7 y se representan en la figura 7.6.

Figura 7.6. Influencia del tiempo de secado sobre la IFR del morestan.

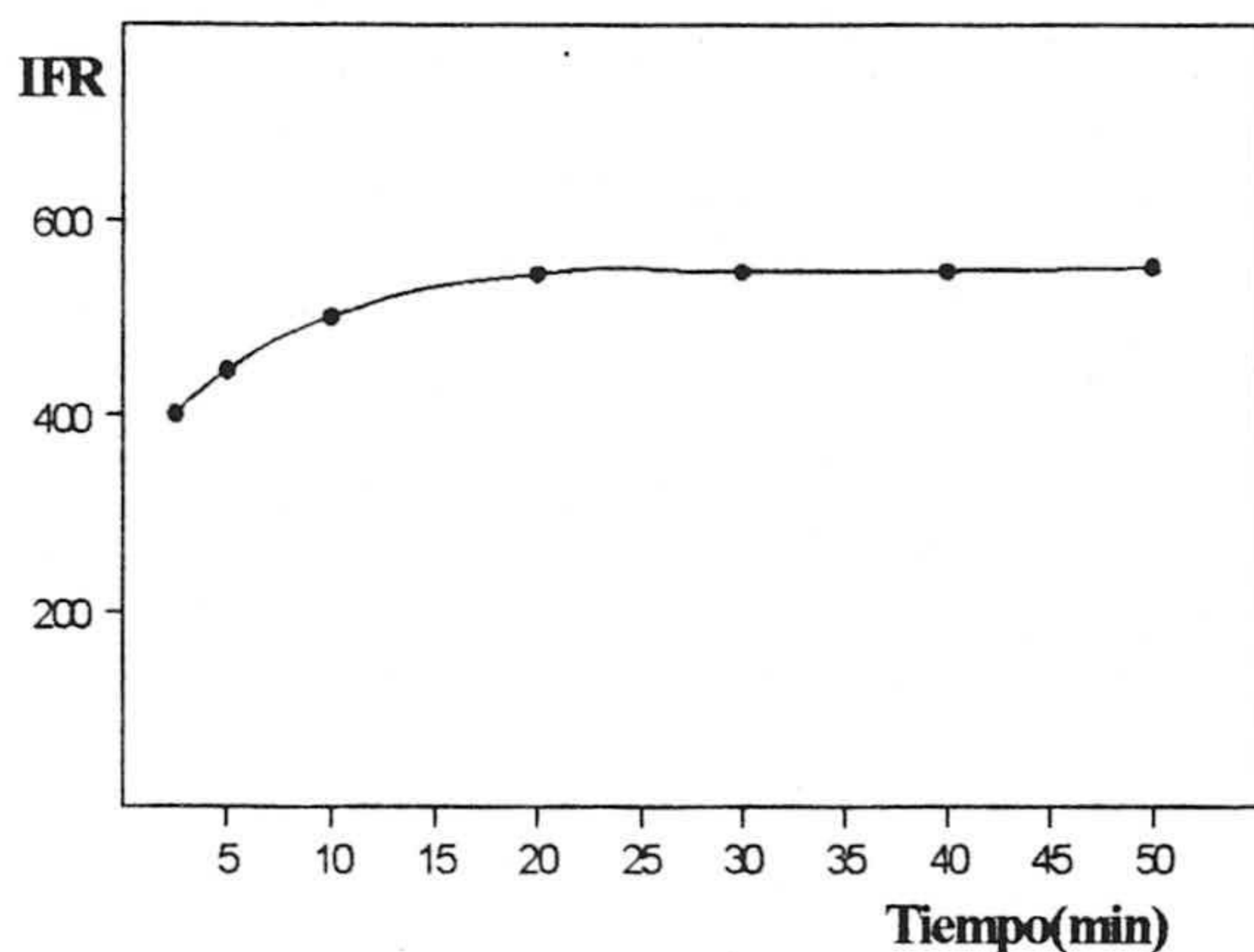


Tabla 7.7.

T (min)	IFR	DNR%
2,5	401,5	3,1
5	444,4	3,0
10	501,2	2,3
15	544,2	2,0
20	544,0	3,1
30	543,8	2,9
40	542,8	2,4
50	550,3	3,1

De los datos obtenidos se puede observar que la señal de fosforescencia crece al aumentar el tiempo de secado hasta alcanzar un valor máximo a los 20 minutos, a partir del cual permanece estable. Para posterior experiencias se fijó el tiempo de secado en 20 minutos tiempo que será suficiente para una adecuada eliminación del disolvente y formación de la membrana.

7.2.2. Variables que influyen en la interacción del analito con el sensor.

7.2.2.1. Influencia de átomo pesado. Como es sabido la presencia de átomo pesado ejerce un papel muy importante sobre el proceso de emisión fosforescente. En

la mayoría de los casos su presencia no sólo es decisiva para que se lleve a cabo el proceso fosforescente sino que además, una adecuada elección del metal pesado o del anion, permite incrementar sensiblemente la intensidad de la señal fosforescente gracias a que facilita el proceso de tránsito electrónico entre el estado singlete excitado y el estado triplete, como consecuencia de un incremento en el acoplamiento spin-orbital entre ambos estados.

Para conocer la influencia del átomo pesado se llevaron a cabo experiencias de diferentes tipos: añadiendo el átomo pesado a la disolución que contiene el analito antes de equilibrar con el sensor y por otra parte incluyendo el metal pesado en forma lipofílica en la membrana durante su preparación.

En el primer caso se ensayaron Pb(II) y Tl(I) en forma de acetato y yoduro, bromuro y cloruro como sales sódicas todos ellos en una concentración de 2 M operando sobre una disolución de morestan de $0,2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ en la forma descrita con anterioridad. En la tabla 7.5 se encuentran los resultados obtenidos que muestran que no ejercen ninguna influencia.

Tabla 7.5.

Especie	IFR	DNR%
sin	256,8	3,2
Tl(I)	240,2	4,1
Pb(II)	231,7	3,2
Cl ⁻	244,8	2,7
Br ⁻	251,3	3,6
I ⁻	239,5	2,0

En segundo lugar se ensayó la introducción del átomo pesado lipofilizado en la membrana. Para ello se seleccionaron plomo como Pb(CH₃CH₂)₄ y bromo como CH₃CH₂Br y se prepararon membrana con cantidades diferentes de estos componentes.

La tabla 7.6 muestra que no aumenta la señal fosforescente con diferentes volúmenes de estos. Por ello se concluyó que no era necesario el empleo de átomo pesado para exaltar la fosforescencia de MOR.

Tabla 7.6. $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{CH}_2)_4$ $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Br}$

V(μL)	IFR	V(μL)	IFR
1	241,2	1	217,7
5	250,1	5	229,2
10	237,6	10	221,3
15	249,2	15	217,9
20	240,9	20	233,7

Todos los datos son las medias de tres medidas independientes para cada uno de los casos

7.2.2.2 Forma de equilibración.

La forma en que se pone en contacto la membrana con el analito es decisiva en la respuesta. Esta puede ser por deposición o por inmersión del sensor en una disolución del mismo y, dentro de esta última modalidad, puede ser sin agitación o con agitación que puede llevarse a cabo por rotación con agitador magnético o por sacudimiento en un agitador vibratorio.

Una vez realizados una serie de ensayos, se comprobó que el mejor resultado se obtenía por inmersión del analito, tal como se ha hecho en anteriores experiencias y con agitación de la disolución con ayuda de un agitador magnético

7.2.2.3. Influencia del tiempo de agitación

Uno de los factores experimentales decisivos en esta forma de poner en contacto la membrana con el analito, es el tiempo de agitación del sensor con la disolución del analito. Para ello se realizó una experiencia en la que se midió la señal de fosforescencia transmitida, para distintas muestras agitadas durante distintos periodos de tiempo que abarcan desde 15 hasta 360 minutos, manteniendo constantes

las restantes variables experimentales. Los datos obtenidos de tres réplicas se resumen en la tabla 7.8 y se representan en la figura 7.7.

Figura 7.7. Influencia del tiempo de la agitación sobre la IFR del morestan ($0,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

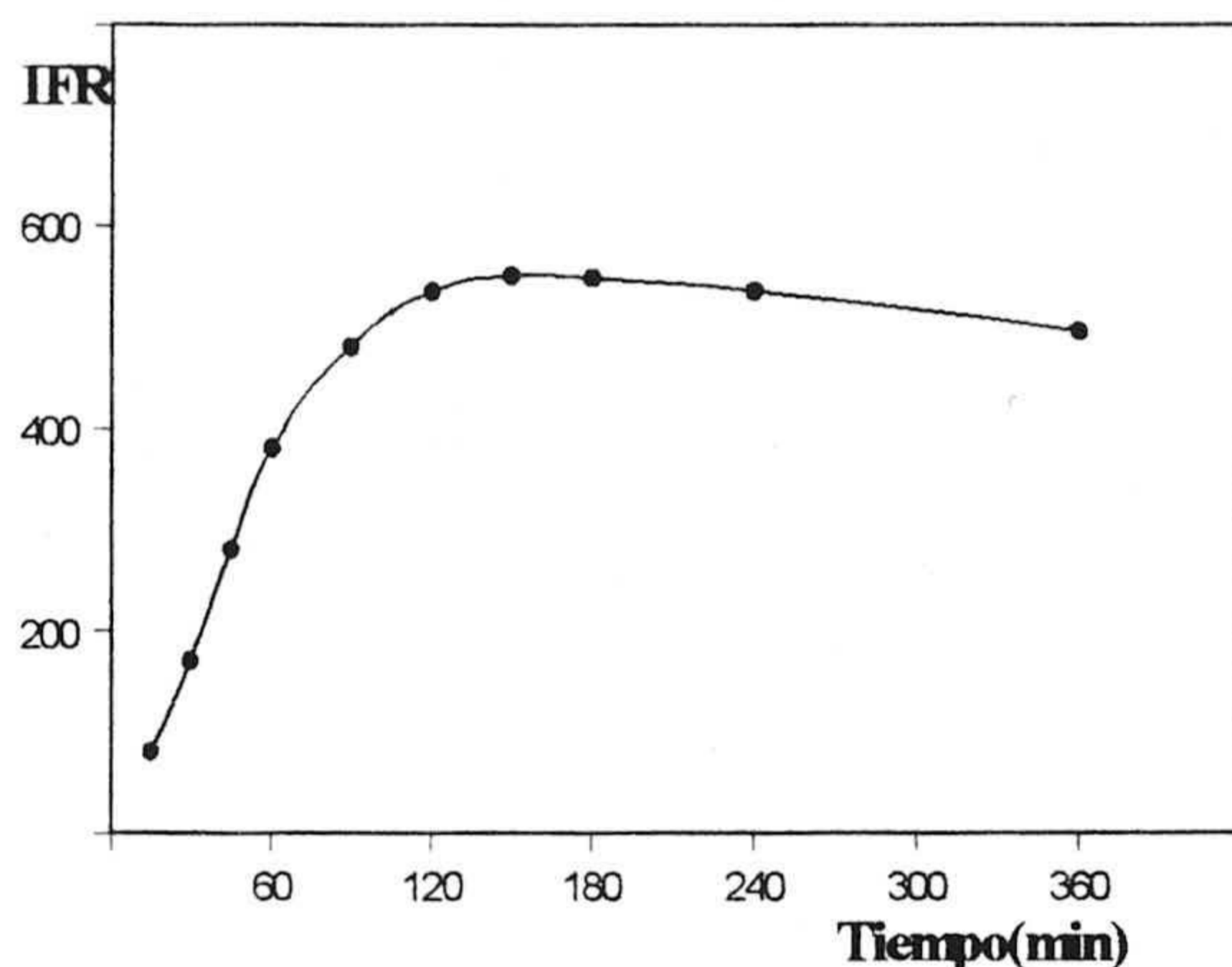


Tabla 7.8.

T(min)	IFR	DNR %
15	80,6	4,2
30	171,7	3,2
45	280,6	2,3
60	380,3	2,6
90	478,8	2,2
120	538,7	2,0
150	550,7	2,3
180	547,5	1,7
240	536,6	2,5
360	496,0	2,2

Se observa que la fosforescencia crece al aumentar del tiempo de agitación hasta alcanzar un valor máximo a los 120 minutos, a partir del cual permanece estable con una ligera tendencia a disminuir (un 10% en la cuatro horas siguientes al máximo que se encuentra a la dos horas). Para posteriores experiencias se fijó el tiempo de agitación en 120 min. El tiempo de equilibración es alto pues hay que tener en cuenta que este sensor responde a la concentración de morestan en el medio mediante un proceso de preconcentración en la microzona, auxiliado por la agitación que evita el transporte por difusión en la disolución hacia la membrana.

7.2.1.2.4. Influencia del pH del medio

Para establecerla se prepararon una serie de vasos de 100 mL de capacidad con disoluciones de morestan en las que el pH variaba entre 0,5 y 13,5 utilizando

para ello disoluciones de HCl y NaOH de diferentes concentraciones y manteniendo las mismas condiciones experimentales anteriormente reseñadas. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 7.9 y 7.10, y se representan en la figura 7.8.

Figura 7.8. Influencia de pH del medio sobre la IFR del MOR.

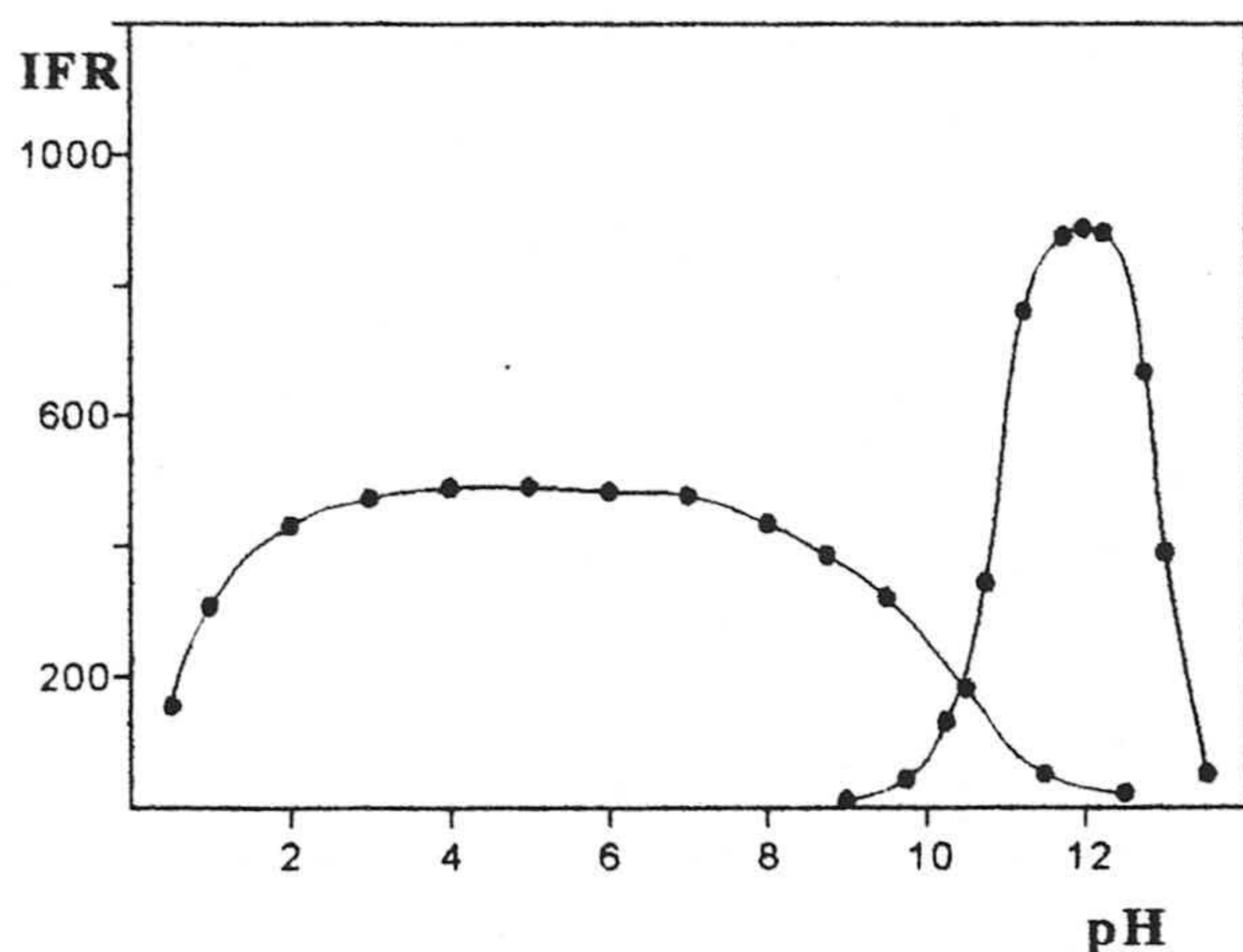


Tabla 7.9

pH	IFR	pH	IFR
0,53	154,3	7,2	476,2
1,1	308,5	8,1	433,2
2,1	430,1	8,8	386,5
3,0	471,2	9,5	321,4
4,6	488,7	10,5	182,7
5,0	483,3	11,7	51,9
6,3	476,2	12,5	22,7

Tabla 7.10

pH	IFR	pH	IFR
9,2	10,5	11,8	876,1
9,8	43,0	12,0	887,2
10,3	130,3	12,8	667,3
10,8	343,1	13,0	389,6
11,3	760,2	13,5	51,8

Se observa que entre pH 2,2 y 8,0 la fosforescencia se mantiene prácticamente constante. Por encima de pH 8 comienza a disminuir a esa longitud de onda de emisión, apareciendo fosforescencia a $\lambda_{em} = 542$ nm con mayor eficiencia pues prácticamente se duplica la señal. Este cambio en la emisión de fosforescencia lo podemos atribuir al proceso de hidrólisis que sufre la molécula de morestan a pH aproximadamente 11,5, dando como resultado la formación de 2,3-dimercapto-6-metilquinoxalina [1], que al pH indicado se presenta en forma disociada mostrando la fosforescencia que podemos ver en la figura 7.8.

Como conclusión indicamos que al no variar la señal de fosforescencia en un amplio rango de pH, podemos trabajar sin necesidad de utilizar disolución reguladora ya que el pH natural de la disolución de MOR se encuentra en la zona central del intervalo en el cual la fosforescencia es máxima.

7.2.2.5. Influencia de la fuerza iónica.

Con el fin de conocer la influencia de la fuerza iónica sobre la fosforescencia del morestan se usó cloruro de sodio como electrólito. Para ello se prepararon una serie de disoluciones conteniendo $0,1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de morestan y cantidades crecientes de NaCl. Tras equilibrar con sensores se realizaron las medidas de fosforescencia de la misma forma que hemos descrito con anterioridad. Los resultados experimentales obtenidos de tres réplicas son los que figuran en la tabla 7.11

Tabla 7.11. Influencia de la fuerza iónica sobre la IFR del MOR.

[NaCl]M	IFR	DNR (%)	[NaCl]M	IFR	DNR (%)
0,00	250,3	1,8	0,80	250,3	2,0
0,05	248,9	3,3	1,00	249,8	2,8
0,10	252,3	2,9	1,25	251,9	3,4
0,20	251,3	1,7	1,50	248,8	2,9
0,40	247,8	3,4	1,75	251,3	2,3
0,60	253,7	2,9	2,00	249,9	1,7

De la tabla 7.10, observamos que en el rango estudiado de la concentración de NaCl, la fuerza iónica no influye sobre la intensidad relativa de fosforescencia del MOR, lo cual será de gran interés para posibles aplicaciones.

7.2.2.6. Influencia del tiempo de secado de la membrana tras la equilibración.

Las membranas de PVC sufren un lento proceso de hidratación que da lugar a la existencia tanto de agua disuelta como a la formación de agregados mole-

culares de agua en el interior de la membrana [2,3]. Experimentalmente comprobamos que la medida de la fosforescencia sobre sensores recién equilibrados da lugar a menores señales. Este hecho se relaciona con la presencia de agua en su interior, lo que podría atenuar el proceso de emisión fosforescente. Se procedió por ello a secar la membrana usando diversos sistemas (lámpara de IR, secado con corriente de aire frío o caliente y secado a vacío en desecador). Se encontraron mejores resultados con el secado a vacío en desecador cargado con cloruro cálcico anhidro. Por esto se estableció cual es el tiempo de secado mas adecuado.

Para ello se realizó una experiencia en la que se midió la fosforescencia transmitida de distintos sensores secados a vacío sobre cloruro de calcio durante distintos periodos de tiempo de hasta 50 minutos. Las condiciones instrumentales fueron las mismas utilizadas anteriormente. Los datos obtenidos a partir de tres réplicas independientes para cada uno de los casos se resumen en la tabla 7.12 y se representan en la figura 7.9.

Figura 7.9. Influencia del tiempo de secado sobre la IFR del MOR.

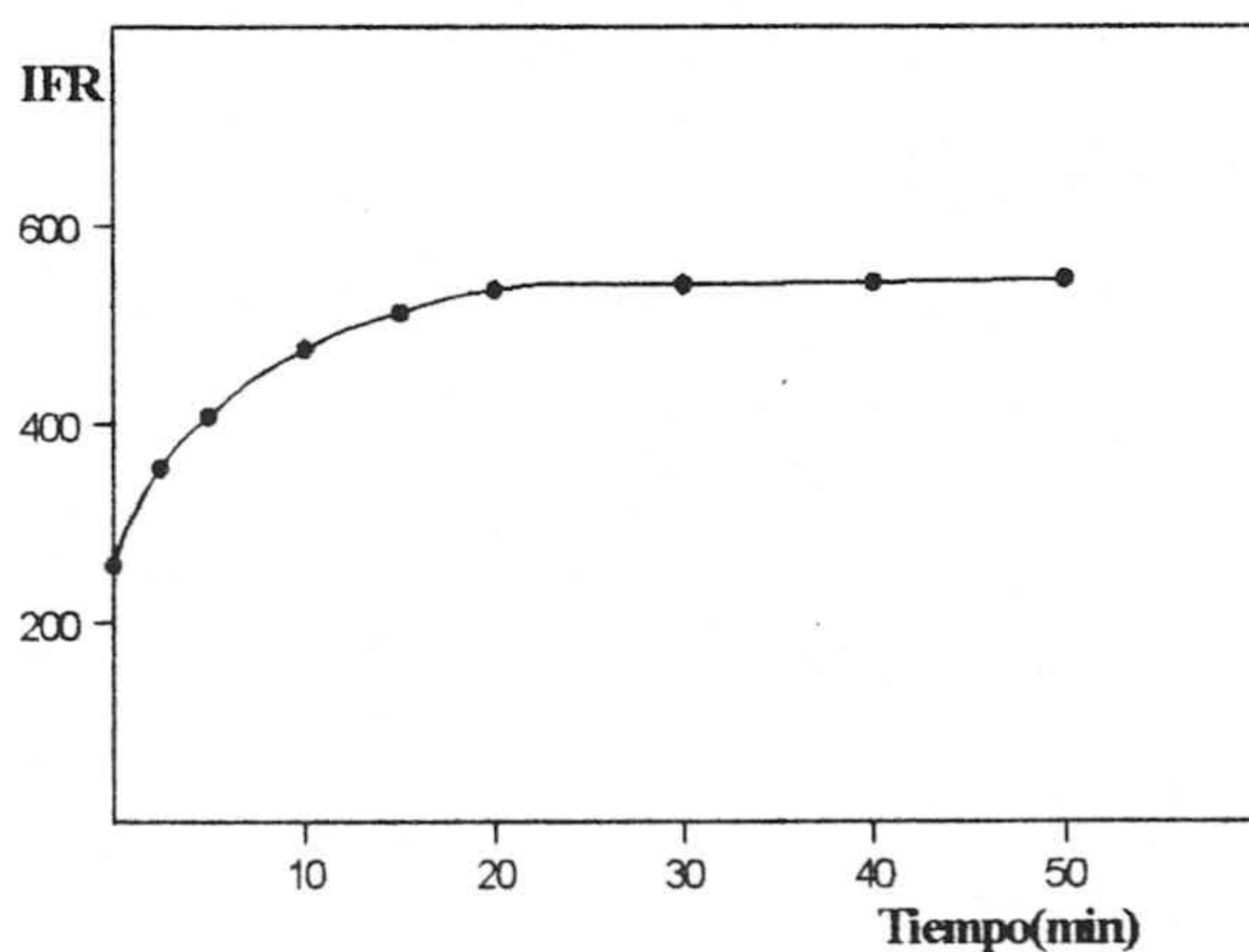


Tabla 7.12.

T(min)	IFR	DNR%
0	254,9	4,5
2,5	355,6	3,4
5	409,8	1,8
10	475,9	2,3
15	512,4	2,9
20	536,2	2,1
30	542,7	1,4
40	547,6	1,7
50	548,9	2,7

Se observa que la fosforescencia crece al aumentar el tiempo de secado hasta alcanzar un máximo a los 20 minutos, a partir de los cuales permanece estable. Para posteriores experiencias se fijó el tiempo de secado en 20 minutos.

7.2.3. Variables instrumentales.

De los diversos factores relacionados con la medida de fosforescencia el primero de ellos es la necesidad de usar una atmósfera exenta de oxígeno y humedad.

7.2.3.1. Influencia de una corriente de nitrógeno seco.

Para establecer esta influencia se opera sobre disoluciones que contenían $0,2 \mu\text{g. mL}^{-1}$ de morestan operando en las condiciones antes establecidas. Las medidas se realizaron usando una corriente de N_2 desecado sobre CaCl_2 anhidro a un flujo de $0,2 \text{ kg.cm}^2$, durante diferentes tiempos antes de realizar la medida. Los resultados obtenidos se recogen en la tabla 7.13.

Figura 7.10. Influencia de la presencia de nitrógeno sobre la IFR del MOR

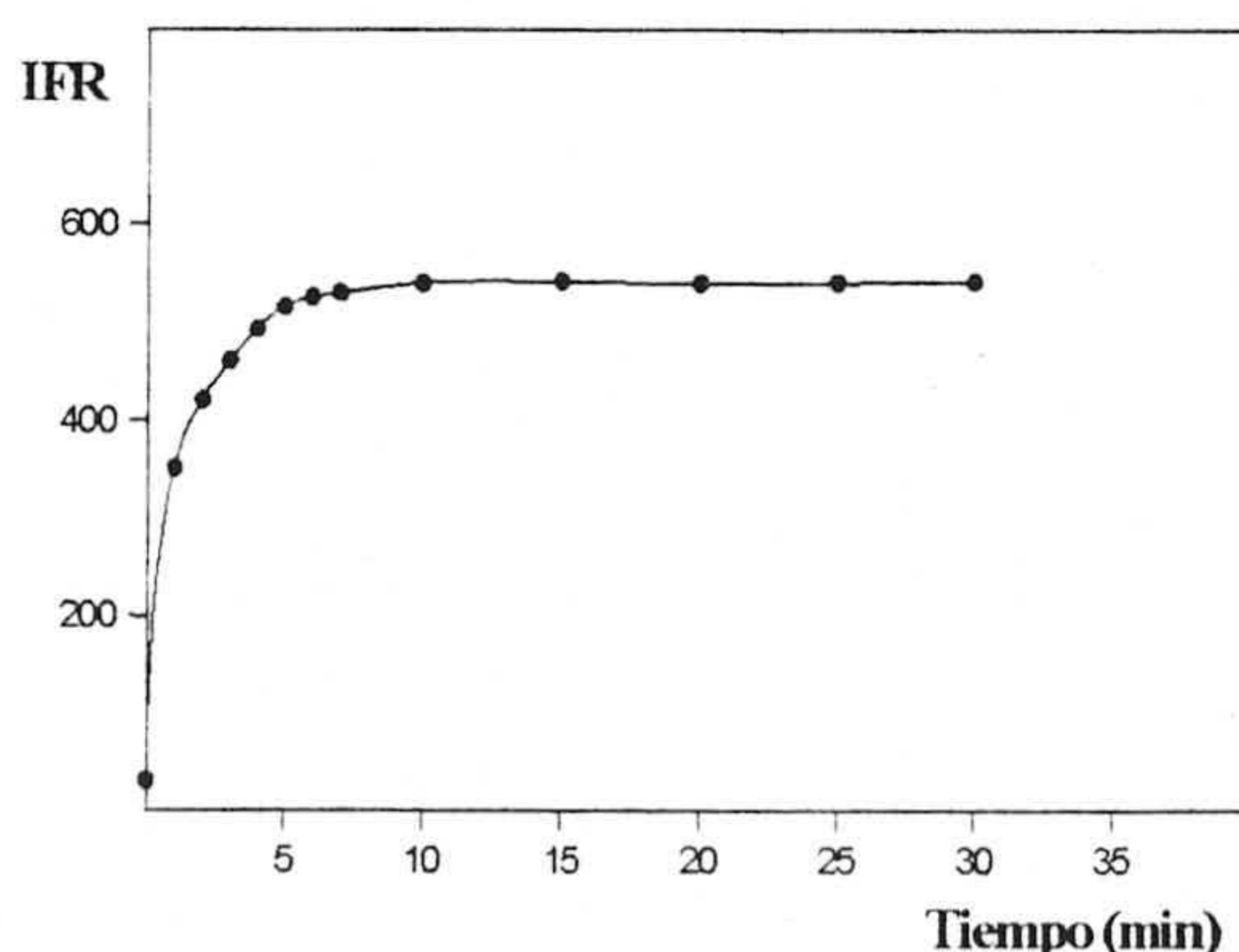


Tabla 7.13.

T (min)	IFR	T (min)	IFR
0	30,7	6	526,6
1,0	241,7	7	530,6
1,5	350,5	10	540,4
2	420,7	15	542,0
3	460,7	20	540,6
4	494,5	25	541,4
5	517,2	30	542,7

En este caso la presencia de N_2 seco origina un considerable aumento de señal por desplazamiento del oxígeno y la humedad. Como en el caso de la determinación de MOR, utilizando papel como soporte sólido, en esta ocasión también se intentó eliminar la necesidad de la corriente de N_2 , cubriendo el sensor con láminas de cuarzo. Sin embargo, en esta ocasión el uso de estas láminas produjo, el efecto deseado ya que la intensidad de fosforescencia decrece prácticamente en la misma proporción tanto con láminas como sin láminas siendo necesario el uso de corriente de N_2 para evitar la disminución de señal fosforescente. El papel parece proteger mejor el analito de la atenuación que el sensor que estamos estudiando.

7.2.3.2. Optimización las rendijas de excitación y de emisión.

Para conocer los valores óptimos correspondientes a las anchuras de las rendijas de excitación y emisión, se registraron los espectros de emisión de diferentes muestras preparadas en la forma indicada en experiencias anteriores. Las medidas de intensidad de fosforescencia se realizaron a $\lambda_{exc} = 363$ nm, y $\lambda_{em} = 520$ nm variando alternativamente las rendijas de emisión y excitación y manteniendo constantes los demás parámetros instrumentales. De los resultados obtenidos se deduce que 5 y 10 nm, para excitación y emisión respectivamente, son los valores más favorables y fueron usados para posteriores experiencias.

7.2.2.3. Optimización de los tiempos de retraso y de lectura de detector (t_g y t_d).

Para el estudio de estas variables instrumentales se procedió de forma similar a la del apartado anterior, midiendo la intensidad de fosforescencia para tiempos de retraso (t_d) comprendidos entre 0,1 y 0,3 ms y tiempos de lectura del detector (t_g) comprendidos entre 1 y 11 ms. El valor mínimo de t_d fue de 0,1 ms

porque corresponde al pulso de la lámpara de xenón existente en el instrumento y el tiempo máximo de lectura del detector (t_g) fue de 11 ms porque está impuesto por las características técnicas del propio instrumento. Los resultados obtenidos en esta experiencia se resumen en la tabla 7.14.

Tabla 7.14. Influencia de t_g y t_d sobre la IFR.

t_d (ms)	t_g (ms)	IFR	t_d (ms)	t_g (ms)	IFR
0,10	6	250,3	0,20	6	263,7
0,10	8	353,5	0,20	8	372,5
0,10	10	495,9	0,20	10	505,9
0,10	12	540,7	0,20	12	567,9
0,15	6	265,3	0,30	6	269,9
0,15	8	363,8	0,30	8	381,3
0,15	10	500,4	0,30	10	505,8
0,15	12	568,7	0,30	12	570,2

De los resultados obtenidos se puede deducir que al aumentar el tiempo de lectura del detector (t_g), manteniendo constante el tiempo de retraso (t_d), aumenta la intensidad fosforescente emitida observándose un incremento similar en todos los casos, mientras que al aumentar del tiempo de retraso, manteniendo el de lectura del detector, la intensidad fosforescente, emitida es prácticamente la misma cualquiera que sea el valor de t_d . La elección de los valores de t_g y t_d que hemos hecho ha sido 10 y 0,15 respectivamente.

7.2.3.4. Influencia del ángulo de incidencia de la radiación.

En la introducción de esta Memoria se puso en manifiesto que existe una dependencia de la señal fosforescente con el ángulo de incidencia de la radiación excitante en el caso de medir fosforescencia en medios homogéneos como en el caso del sensor propuesto. Dependencia que a su vez es función de las rendijas de entrada y salida.

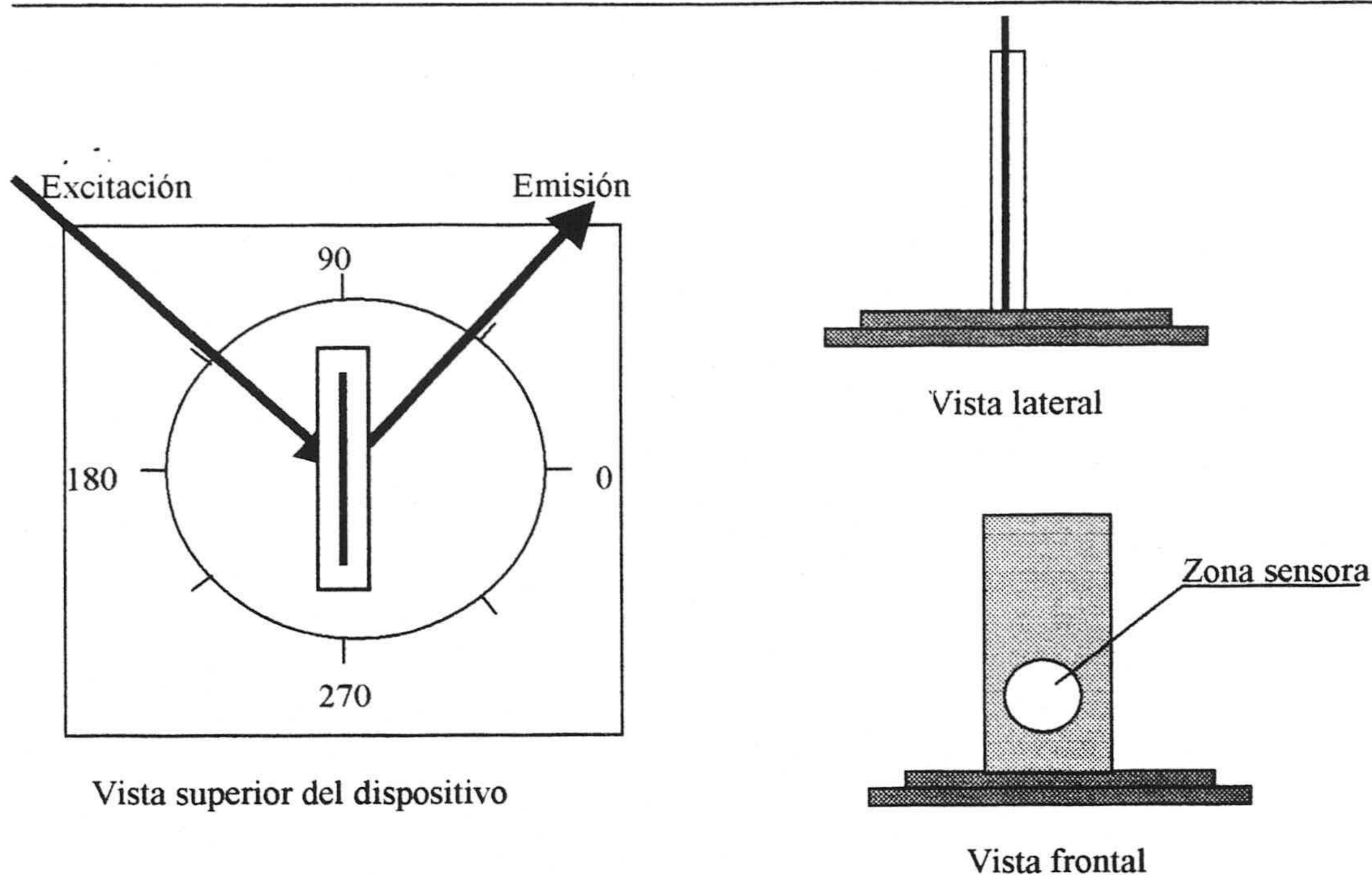


Figura 7.11. Dispositivo empleado para medir la influencia del ángulo de incidencia de la radiación

Ahora tratamos de verificar aquella dependencia y establecer las condiciones adecuadas de medida.

Para hacer este estudio se construyó un sencillo dispositivo que consta de una base circular giratoria solidaria con un porta que permite introducir el sensor. Haciendo girar este dispositivo se pueden realizar lecturas de señal de fosforescencia cada 5° . En la figura 7.11 aparece un dibujo esquemático de dicho dispositivo.

A continuación se prepararon una serie de sensores equilibrando estos con disoluciones de $0,2 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ de morestan. Los resultados de medir la señal de fosforescencia a diferentes ángulos y rendijas de excitación y emisión se recogen en las siguientes tablas 7.15 a 7.20.

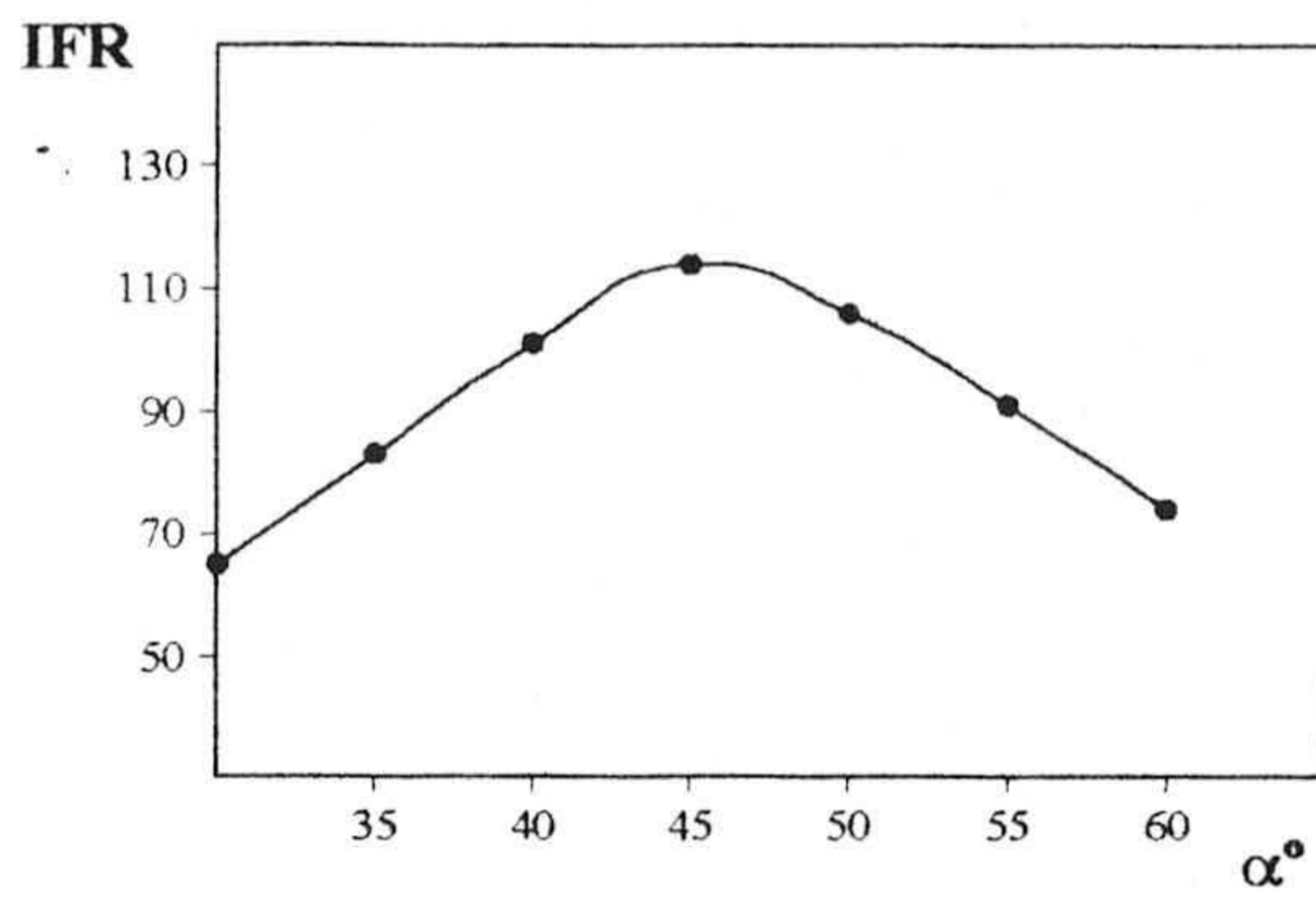


Tabla 7.15 (2,5/2,5)

Ángulo (grados)	IFR
30	65
35	83
40	101
45	114
50	106
55	91
60	74

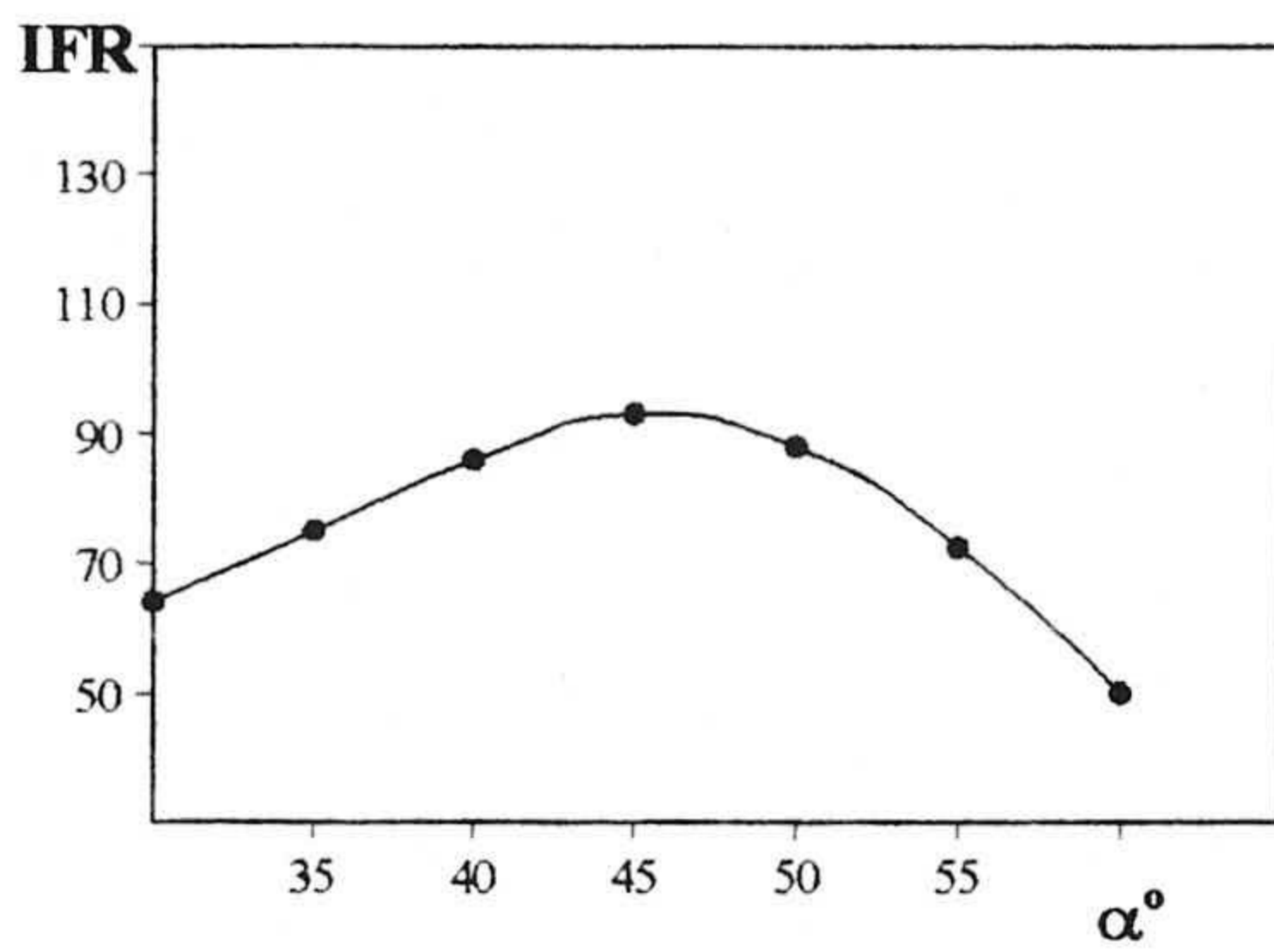


Tabla 7.16 (5/5)

Ángulo (grados)	IFR
30	64
35	75
40	86
45	93
50	88
55	72
60	50

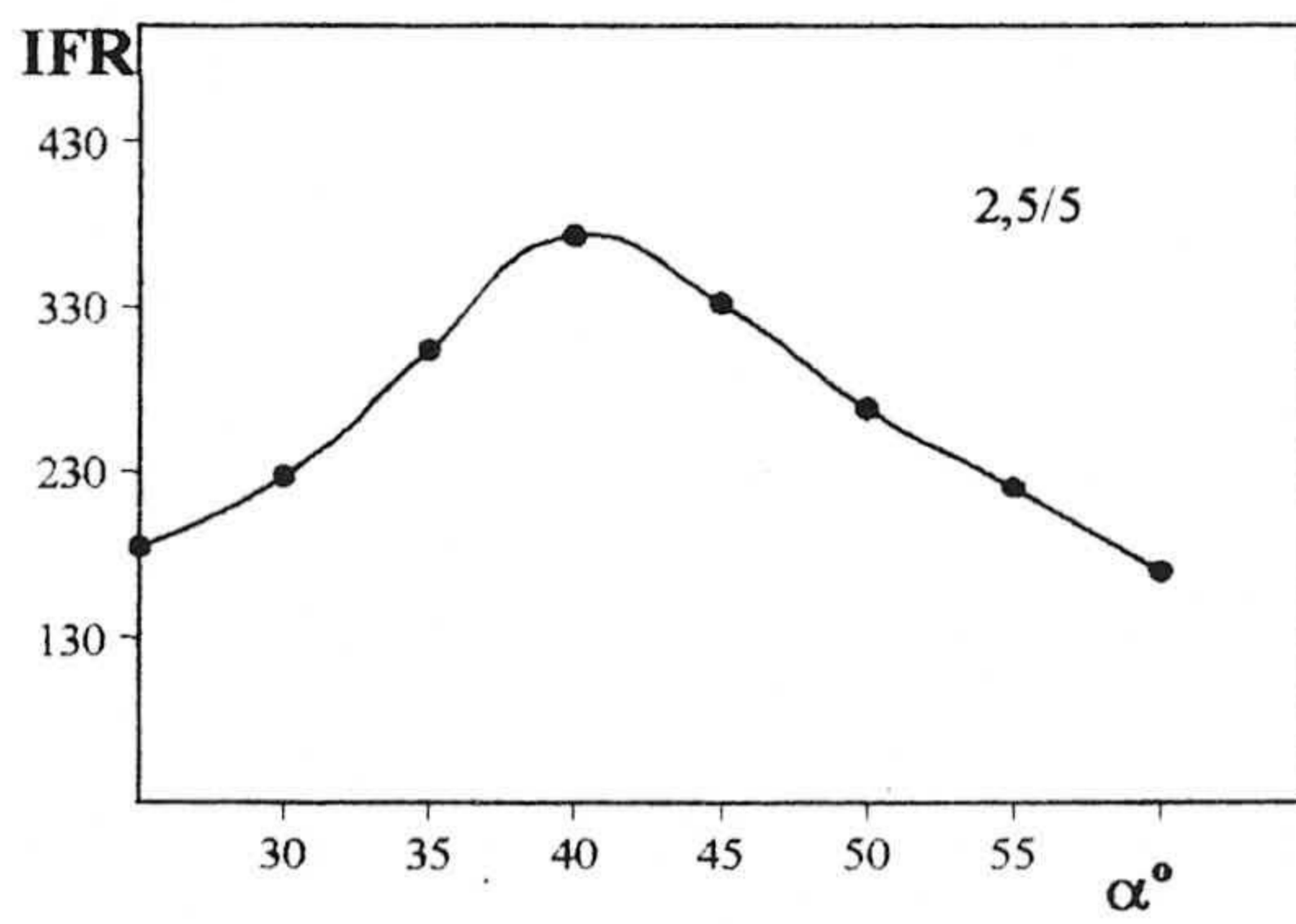


Tabla 7.17 (2,5/5)

Ángulo (grados)	IFR
25	185
30	227
35	304
40	373
45	332
50	268
55	220
60	170

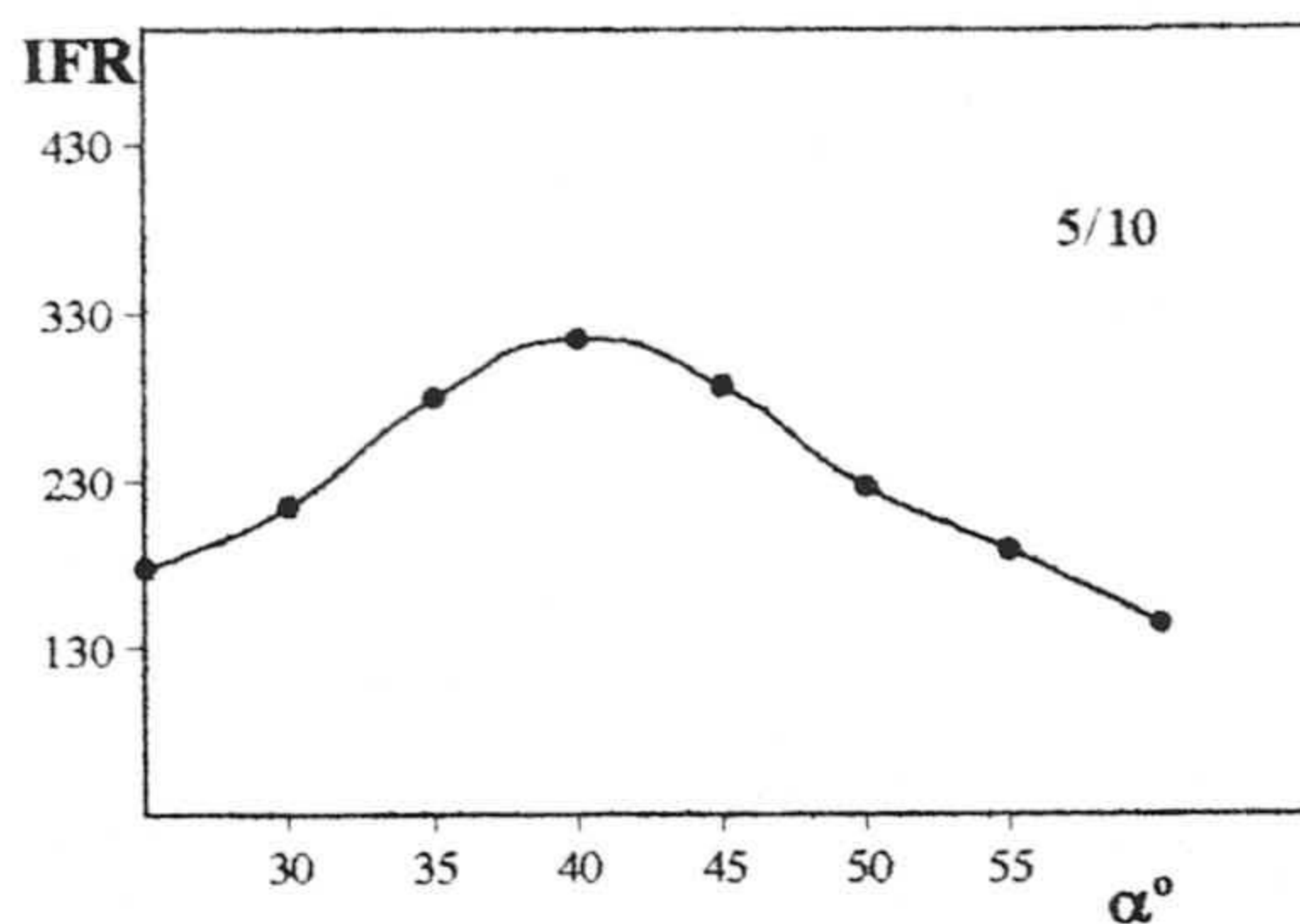


Tabla 7.18 (5/10)

Ángulo (grados)	IFR
25	178
30	215
35	280
40	315
45	287
50	227
55	189
60	145

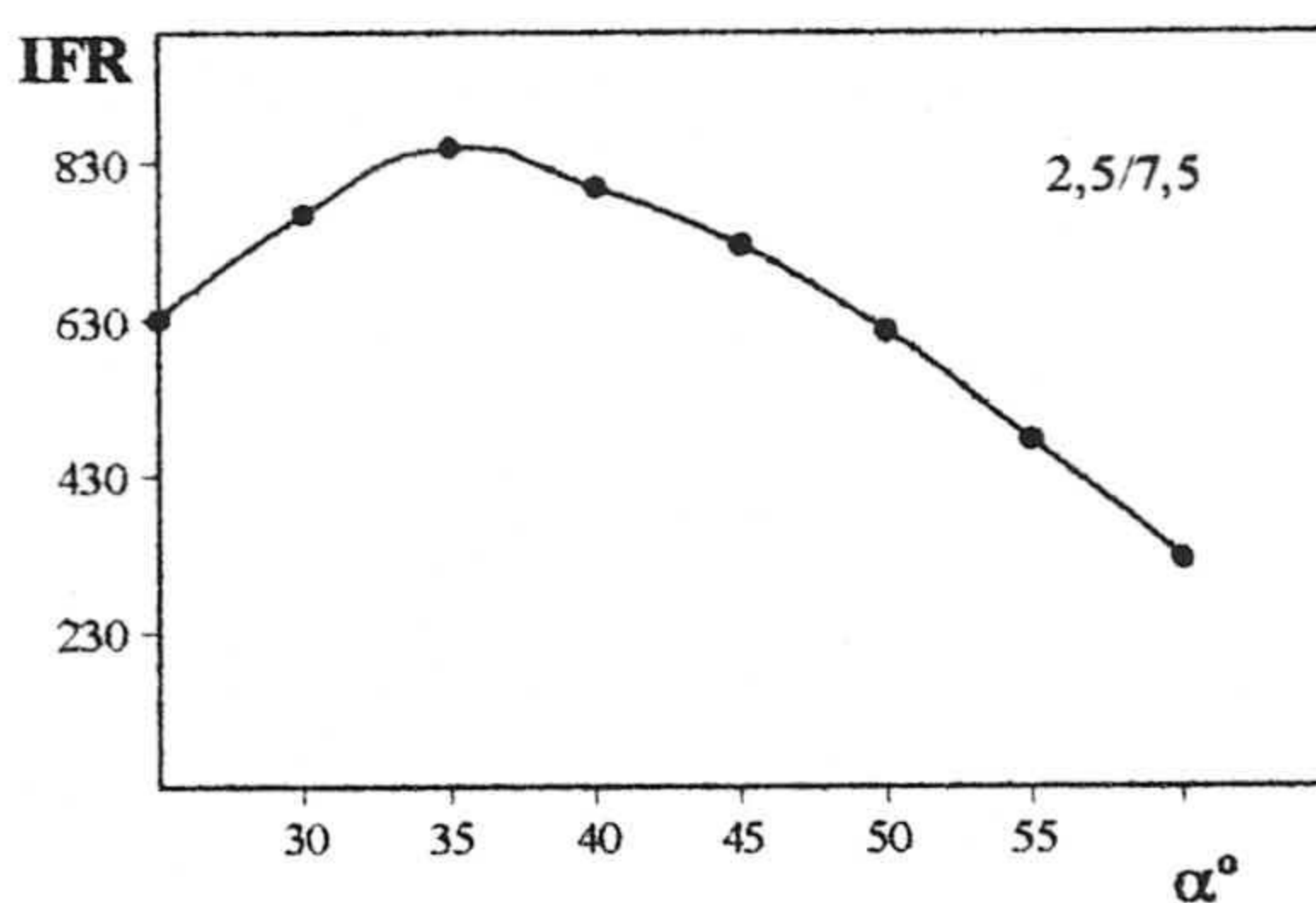


Tabla 7.19. (2,5/7,5)

Ángulo (grados)	IFR
25	630
30	765
35	850
40	799
45	725
50	616
55	477
60	324

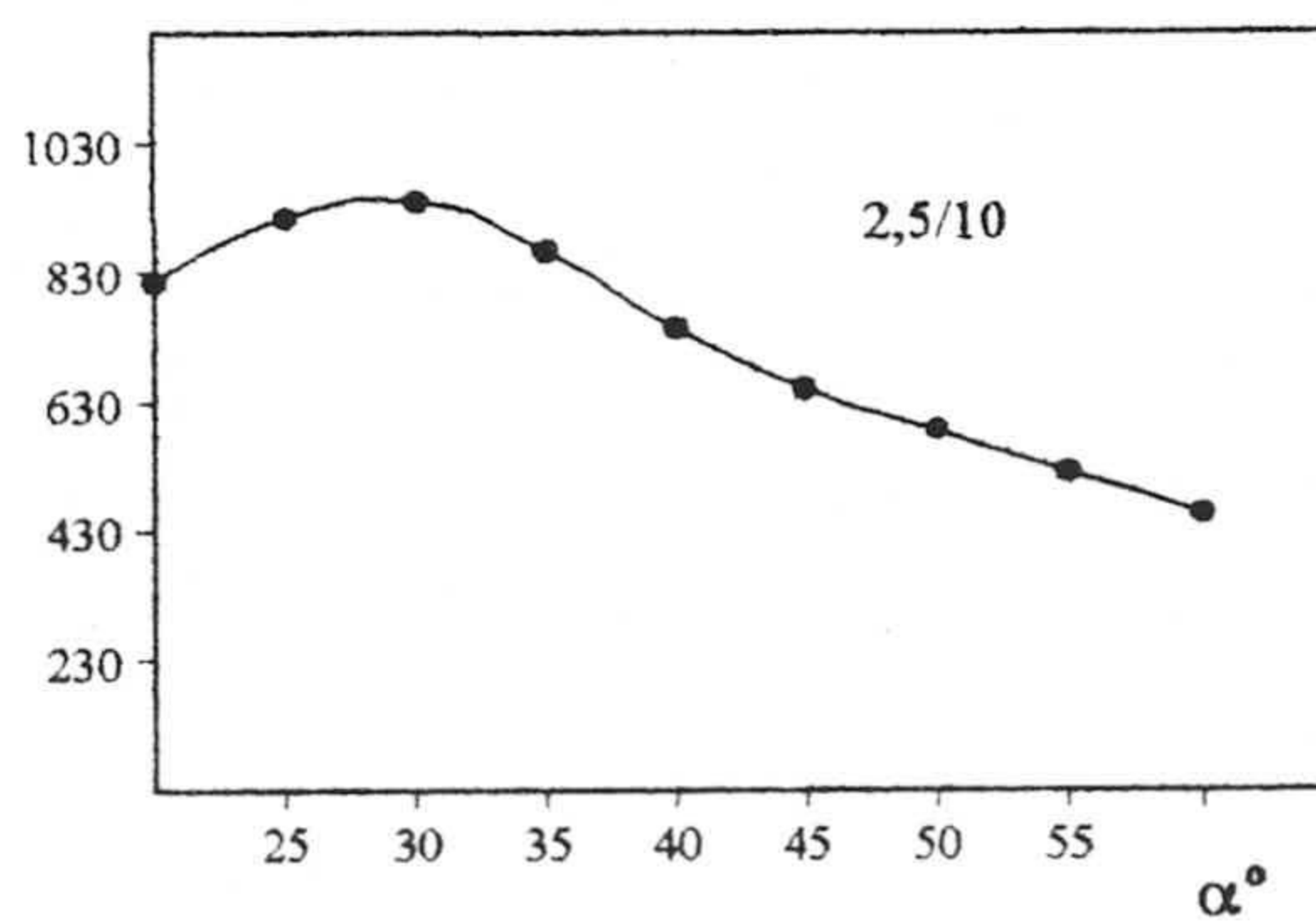


Tabla 7.20 (2,5/10)

Ángulo (grados)	IFR
20	815
25	915
30	941
35	864
40	744
45	650
50	586
55	521
60	457

De la observación de los datos tabulados y de las correspondiente figuras podemos obtener la conclusión de que existe una relación entre las rendijas de excitación, emisión y el ángulo formado entre el haz de excitación y el plano del soporte sólido que contiene al analito. Aumenta la señal fosforescente hasta el llegar a un máximo dependiente de los valores de las rendijas de excitación y emisión, decreciendo a continuación dicha señal hasta llegar a un mínimo. Dicha máximo se debe al compromiso entre la irradiación de la máxima área posible de la superficie por parte del haz de excitación y que incida sobre el detector la máximo cantidad de emisión fosforescente; que, aunque sale como radiación difusa, lleva una

Tabla 7.21

Rendijas (R_{ex}/R_{em})	Valor teórico	Valor obtenido
2,5/2,5	45°	46,0°
5/5	45°	46,0°
2,5/5	38,43°	40,0°
5/10	38,43°	40,0°
2,5/7,5	34,73	34,9°
2,5/10	32,12°	30,1°

emergencia normal, pues a diferencia de lo ocurre en la emisión fosforescente o fluorescente en disolución, aquí la señal está aproximadamente en un plano. Tal como vimos en la introducción tal relación existe y los valores teóricos se ajustan razonablemente a los encontrados en la práctica, tal como vemos en la tabla 7.21.

De la anterior experiencia se deduce que utilizando 5/10 nm como valores de las rendijas de excitación/emisión, el ángulo óptimo es 38,43 ° en lugar del ángulo de 45 ° que hemos utilizado a lo largo de este estudio. Las razones por las que se tomó como ángulo de medida 45 ° y rendijas de 5/10 nm son las siguientes:

- 1° La diferencia de intensidad de fosforescencia entre las medidas con ángulos de $38,45^\circ$ y 45° con rendijas de 5/10 nm es inferior al 10% del valor total de la señal medida.
- 2° Si utilizamos las rendijas de 5/5 nm y el ángulo óptimo que les correspondería (45°) la señal fosforescente disminuye desde 287 (tabla 7.18) hasta 93 (tabla 7.16) es decir, disminuye un 69,2 %.
- 3° Utilizando rendijas de excitación superiores a 5 nm la dispersión de las medidas aumenta sensiblemente.
- 4° Si utilizamos rendijas cuyos valores estén en proporción mayor al $\frac{1}{2}$ (por ejemplo, 2,5/10 de la tabla 7.20) también aumenta la desviación estándar de las medidas y el ángulo óptimo ha de ser 32° .
- 5° Construir el dispositivo de medida (figura 1.5 de la página 96 de esta Memoria) con un ángulo de $38,43^\circ$ presenta serios problemas de tipo mecánico difíciles de resolver sin los medios apropiados para ello.

Por estas razones hubo que adoptar, como solución de compromiso, efectuar las medidas con un ángulo de 45° , que no es el óptimo para las rendijas 5/10, pero con cuyos valores se consigue una señal que sólo pierde algo menos del 10 % de su valor.

7.3. PROCEDIMIENTO OPERATORIO PARA PREPARAR LA MUESTRA

Una vez optimizadas las variables experimentales, tanto referentes a la preparación de la muestra como propiamente instrumentales, que afectan a la intensidad de fosforescencia emitida por el analito, podemos establecer el siguiente procedimiento operatorio para la preparación de las muestras: las membranas preparadas como antes se ha dicho se utilizan para retener el analito de la muestra

de la forma que sigue: se introduce la membrana en la disolución del analito y se agita durante dos horas. A continuación, se seca la membrana en un desecador a vacío sobre cloruro de calcio, durante un periodo de tiempo de 20 min y se introduce en el compartimento de muestras del instrumento formando un ángulo de 45° con el haz de excitación y las medidas de intensidad de fosforescencia transmitida a temperatura ambiente se realizaron a $\lambda_{exc} = 363\text{nm}$, $\lambda_{em} = 520\text{nm}$, $t_g = 12\text{ ms}$, $t_d = 0,15\text{ ms}$ con rendijas de 5 y 10 nm de excitación y emisión respectivamente.

7.4. ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE CONCENTRACIÓN DE MORRESTAN Y SEÑAL ANALÍTICA.

Para saber como varia la intensidad de fosforescencia transmitida en función de la concentración de MOR, se realizó la siguiente experiencia: en una serie de matraces de 50 mL de capacidad se introdujeron volúmenes crecientes de disolución de MOR de $10\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de concentración y se enrasaron con disolución hidroalcohólica (etanol/agua 10%v/v). De cada uno de estas disoluciones se prepararon tres muestras replicadas independientes, en la forma indicada en el apartado anterior, y se procedió a la lectura de sus respectivas emisiones fosforescentes. Los datos obtenidos se resumen en la tabla 7.22 y se representan en la figura 7.12.

De los datos de la figura anterior se deduce que existe una relación lineal entre la intensidad de fosforescencia transmitida a temperatura ambiente y la concentración de MOR hasta un valor máximo de $0,2\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de MOR. Para valores superiores de concentración la relación no es lineal ya que la desviación de la curva experimental respecto de la linealidad teórica es superior al 5%.

Figura 7.12. Influencia de la concentración de MOR.

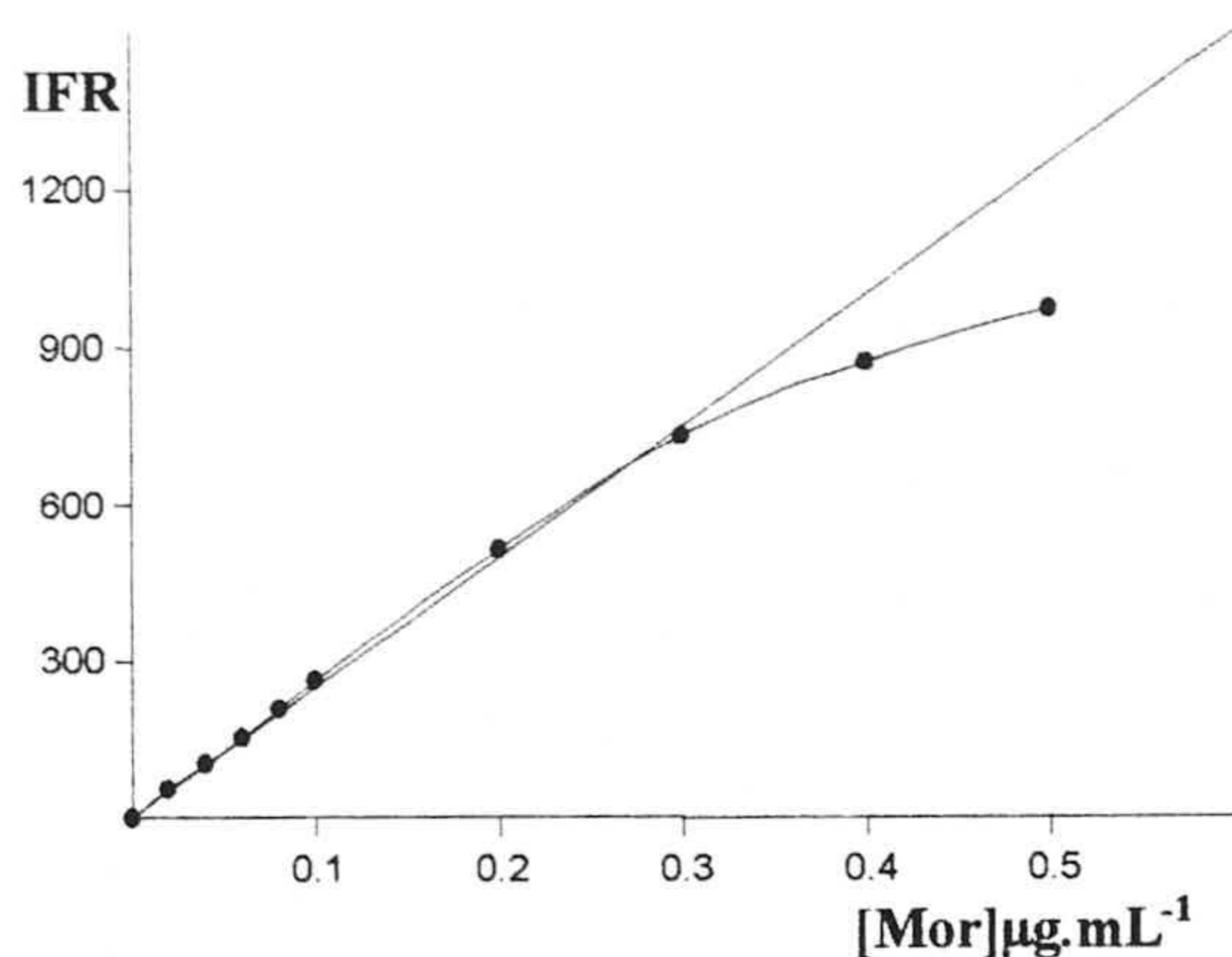


Tabla 7.22.

[MOR] µg.mL ⁻¹	IFR
0,00	0,00
0,01	26,3
0,02	55,8
0,04	104,0
0,06	153,8
0,08	208,4
0,10	260,5
0,20	510,5
0,03	725,3
0,04	872,7
0,05	972,1

Tabla 7.23. Resumen de los valores óptimos de las variables experimentales.

Variables	Valor óptimo	Variables	Valor óptimo
Soporte sólido	poliester tipo Mylar	$\lambda_{exc}, \lambda_{em}$	363/520 nm
átomo pesado	ninguno	Gas inerte	He o N ₂
pH	pH de la disolución	Rendija excitación	5 nm
Volumen de la gota	5 µL	Rendija emisión	10 nm
Volumen de muestra	50 ml	t _d	0,15 ms
Tiempo de secar	20 min	t _g	12 ms
Tipo de secado	a vacío sobre cloruro de calcio	Ángulo de incidencia	45°

7.5. PARÁMETROS ANALÍTICOS.

7.5.1. Función de calibrado

Para establecer la función de calibrado, se prepararon una serie de matraces de 50 mL en los que introdujeron cantidades crecientes de disolución de MOR de 10,0 µg·mL⁻¹ de concentración y etanol /agua (10%v/v) hasta el enrase. A continuación, de cada una de estas disoluciones se prepararon tres muestras replicadas

de acuerdo con el procedimiento previamente establecido y se midieron sus intensidades de fosforescencia en las condiciones anteriormente fijadas. Con los resultados experimentales obtenidos se confeccionó la tabla 7.24 y de ellos se obtuvo la recta de calibrado que representamos en la figura 7.13.

Figura 7.13. Recta de calibrado

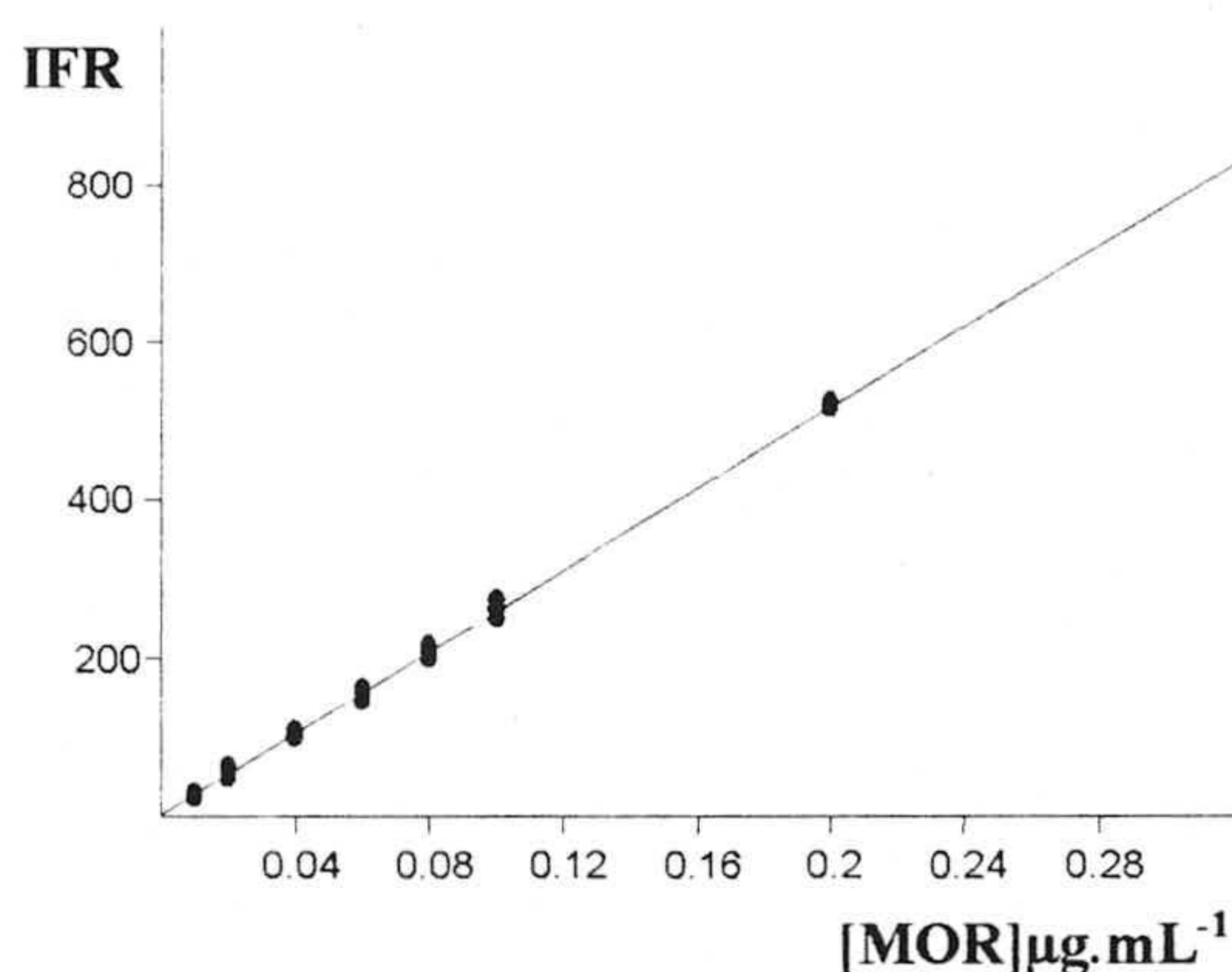


Tabla 7.24.

[MOR] ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	IFR (tres replicas)		
0,01	23,0	29,7	26,1
0,02	55,6	64,1	47,6
0,04	109,5	103,7	98,9
0,06	162,7	145,8	152,2
0,08	208,7	217,7	198,9
0,10	250,8	264,3	275,3
0,20	505,9	525,3	516,7

Mediante el programa informático Statgraphics se obtuvieron los parámetros estadísticos que figuran en la tabla 7.25.

Tabla 7.25. Valores de los parámetros estadísticos del calibrado

Parámetros	Valores encontrados
n	21
m	3
a	1,97
b	2575,9
S_a	2,654
S_b	28,18
$S_{R,C}$	7,71
$P_{R,C}$ (lack of fit)	91,83%
R^2	99,80

n: nº de muestras

m: nº de replicas de la muestra.

a: Ordenada en el origen.

b: Pendiente

S_a : Desviación estándar de la ordenada en el origen.

S_b : Desviación estándar del pendiente.

R: Coeficiente de correlación.

R^2 : Coeficiente de determinación.

$S_{R,C}$: Desviación estándar de regresión.

$P_{R,C}$: Nivel de significación del test de fallo de ajuste (lack of fit)

Se observó que hay un buen ajuste del modelo de regresión lineal, ya que $p > 5\%$. ($p = 91.83$) para un nivel de confianza del 95%. La representación gráfica los residuales frente a la concentración de MOR muestra una distribución aleatoria de los mismos. El análisis de la varianza (ANOVA) realizado en el intervalo lineal comprendido entre 0,01 y 0,2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ pone de manifiesto el buen ajuste lineal del modelo y la ausencia de curvatura.

Tabla 7.26. Resultados del ANOVA correspondiente a los datos experimentales.

Fuente	S.C	g.l	M.C	F _{exp}	P(%)
Modelo	496504,57	1	496504,57	8355,0
Residuales	1129,1010	19	59,4264	
Fallo de ajuste	101,51431	5	20,30286	0,2766	91,834
Error puro	1027,5867	14	73,3990

S.C: Suma de cuadrados.

M.C: Media de cuadrados.

Una vez que se comprueba homoscedasticidad y admitiendo que se cumplen las hipótesis matemáticas del modelo de mínimos cuadrados (normalidad, aleatoriedad e independencia) se obtiene la siguiente función de calibrado:

$$\text{IFR} = 2575,89[\text{MOR}] + 1,971$$

donde [MOR] está expresada en $\mu\text{g.mL}^{-1}$

7.5.2. Linealidad: $\text{Lin}(\%) = [1 - \text{DNR}(b)] \times 100 = [1 - 0,011] \times 100 = 98,90 \%$

donde: $\text{DNR}(b) = S_b/b = 28,181/2575,89 = 0,011 \mu\text{g.mL}^{-1}$

7.5.3. Sensibilidad: a) Sensibilidad de calibrado: $S_{\text{cal}} = b = 2575,89 (\mu\text{g/mL})^{-1}$.

b) Sensibilidad analítica: $S_{\text{anal}} = S_{R,C}/b = 7,709/2575,89 = 0,003 \mu\text{g.mL}^{-1}$

7.5.4. Límites de detección y cuantificación.

Se prepararon 10 disoluciones blanco contiendo todos los reactivos excepto analito y se midieron sus intensidades de fosforescencia transmitida obteniéndose los resultados que se resumen en la tabla 7.27.

Tabla 7.27. Repetibilidad de blanco

Disolución nº	IF (blanco)
1	6,89
2	6,78
3	6,98
4	6,88
5	6,62
6	7,30
7	7,26
8	6,88
9	6,80
10	7,28

$\bar{X} = 6,97$ $S_{n-1} = 0,236$ DNR = 3,4%
--

\bar{X} = Valor medio.
 S_{n-1} = Desviación normal de los blancos.
DNR % = Desviación normal relativa.

Con el fin de calcular los valores de los límites de detección y cuantificación, se utilizaron los resultados de la tabla 7.27 y las definiciones de limite de detección y limite de cuantificación admitidas por la IUPAC, obteniéndose los siguientes valores:

Límite de detección: $LD = 3S_b/b = 0,30 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$

Límite de cuantificación: $LQ = 10S_b/b = 0,92 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$

7.5.5. Rango dinámico lineal

El intervalo de aplicación del método, está comprendido entre el límite inferior, que es el límite de cuantificación y el límite superior que viene determinado por el valor superior que está dentro del intervalo lineal de concentraciones, calculado anteriormente mediante el test de fallo de ajuste.

$$RDL = 0,1 (\text{Lim}_{\text{sup}}/\text{Lim}_{\text{inf}}) = 0,1 (0,2/0,00092) = 21,74$$

7.5.6. Precisión

La precisión se determinó mediante las dos formas establecidas en el Capítulo 1, obteniéndose los siguientes resultados:

Repetibilidad del método propuesto aplicado a una muestra patrón.

Se prepararon diez disoluciones de MOR de 0,2 µg.mL⁻¹ de concentración y, siguiendo la metodología de trabajo establecida anteriormente, se obtuvieron los resultados resumidos en la tabla 7.28 expresados como desviación normal relativa.

Tabla 7.28. Repetibilidad del método

Muestra nº	IFR	Disolución nº	IFR
1	538,2	6	555,1
2	550,1	7	528,2
3	512,3	8	513,5
4	562,7	9	545,7
5	543,5	10	538,6

$\bar{X} = 538,8$
$S_{n-1} = 16,60$
DNR% = 3,1%

Repetibilidad del método a partir de los datos del calibrado.

En la tabla 7.29 se indican los valores de la precisión obtenidos en función de la concentración valores que se representan en la figura 7.14.

Figura 7.14. Repetibilidad en función de la concentración de morestan.

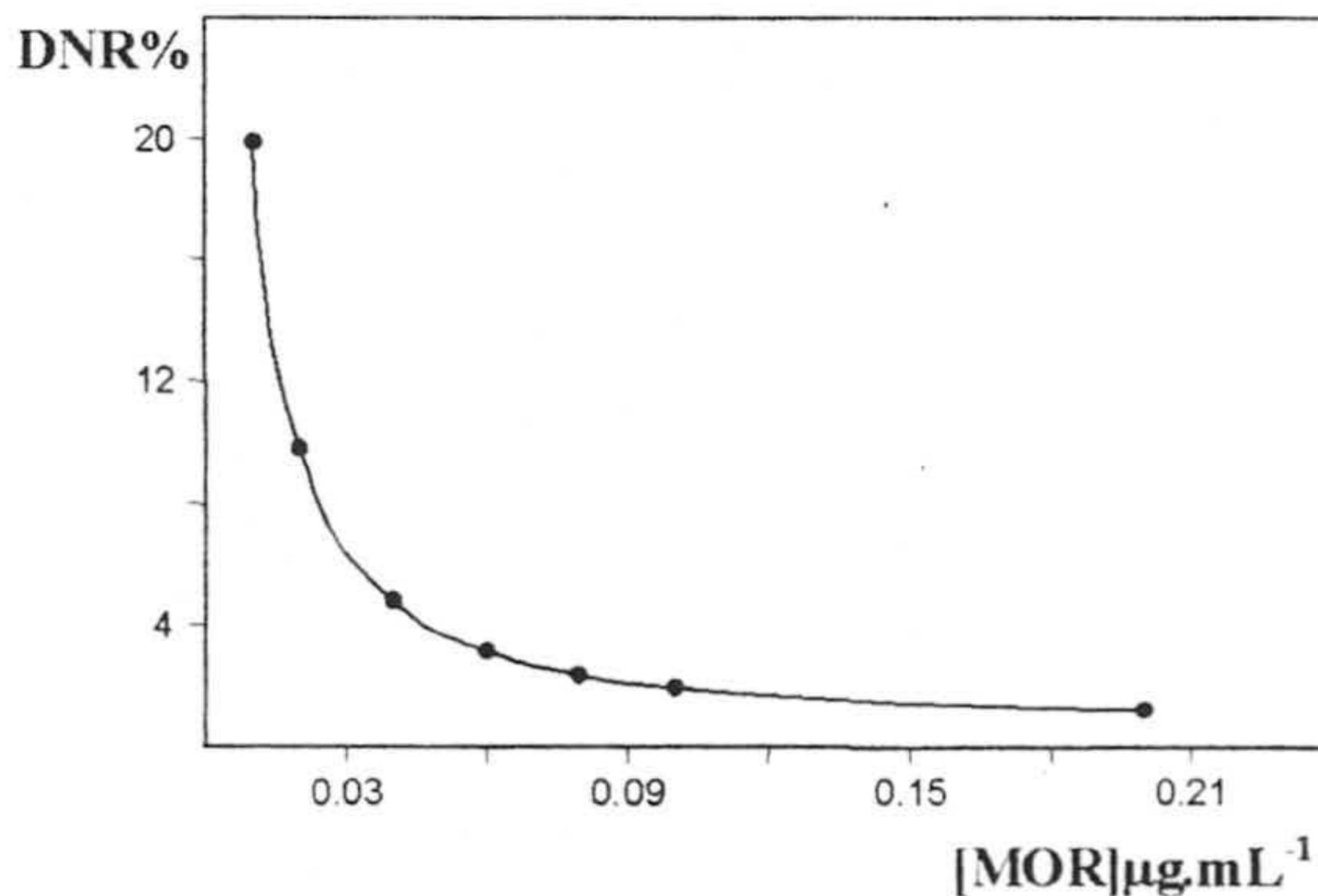


Tabla 7.29

[MOR] µg.mL ⁻¹	S _c	DNR (%)
0,01	0,00199	19,88
0,02	0,00196	9,79
0,04	0,00194	4,79
0,06	0,00190	3,16
0,08	0,00191	2,38
0,10	0,00194	1,96
0,20	0,00242	1,21

En la figura 7.14 observa, como era de esperar, que a medida que aumenta la concentración de MOR analizada, la desviación estándar relativa se hace cada vez menor, ya que dividimos un valor prácticamente constante de desviación estándar entre un valor de concentración cada vez mayor.

Tabla 7.30. Resumen de los parámetros analíticos

Parámetros	Valor
RDL	21,74
Linealidad(%)	98,90
S_{cal}	$2575,9 (\mu\text{g}/\text{mL})^{-1}$
S_{anal}	$0,003 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$
LD	$0,30 \mu\text{g}.\text{L}^{-1}$
LQ	$0,92 \mu\text{g}.\text{L}^{-1}$
r^2	99,8
Fallo de ajuste	91,83%

7.6. ESTUDIO DE LAS INTERFERENCIAS.

Para estudiar la selectividad del método propuesto se ha llevado a cabo un estudio de las interferencias producidas por acompañantes habituales en las matrices a la que se aplicará. Para llevar a cabo este estudio hemos seguido el mismo procedimiento descrito anteriormente. Se prepararon una serie de matraces de 50 mL de capacidad conteniendo en todos los casos, $0,1 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ de MOR y concentraciones crecientes de cada especie extraña. Efectuadas las medidas de fosforescencia y, utilizando la función de calibrado obtenida, se determinó en cada caso el error relativo que origina la presencia de la especie interferente. Los resultados obtenidos están resumidos en la tabla 7.31.

Como podemos apreciar el nivel de selectividad bastante aceptable incluso para especies que muestran fosforescencia como el carbaril, la warfarina o el tia-

bendazol. Ello es debido no solo a la necesidad de que exista un buen coeficiente de reparto del interferente y que muestre fosforescencia, sino también a que la ausencia de átomo pesado en este caso deprime la emisión fosforescente de potenciales interferentes.

Tabla 7.31. Tolerancia de las sustancias extrañas.

Iones y especies extrañas	Tolerancia ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
Diclone, Captan, Lindano Folpet, Paraquat, Dicuat. Benomilo, Terbutrin, Ácido húmico. Warfarina. Carbaril 1-Naftol 1-Fenilfenol, Tiabendazol, Carbendazima Li^+ , Na^+ , K^+ , y NH_4^+ , F^- , Cl^- , Br^- SO_4^{2-} , NO_3^- , PO_4^{3-} , CO_3^{2-} , HCO_3^- Mg^{+2} , Mn^{+2} , Cu^{+2} , Ca^{+2} Al^{+3} , Fe^{+3} y Be^{+2}	> 50 ó nivel saturación en agua. > 20 no interfiere no interfiere > 25 no interfieren no interfieren no interfieren >50 > 50

7.7. APLICACIONES ANALÍTICAS

Para la aplicación del método propuesto al análisis de muestras reales en las que puede encontrarse este compuesto, se eligieron como ejemplo aguas de diversas procedencia, dado que pueden contener este pesticida como consecuencia de prácticas agrícolas.

7.7.1. Determinación de morestan en aguas.

Hemos elegido como casos representativos agua potable de la ciudad de Granada, agua del río Genil, agua del mar Mediterráneo (puerto de la ciudad de Motril), agua residual de entrada y salida del Centro Penitenciario Albolote, (Granada) y aguas minerales de Fontdor, Lanjarón y Font Vella ya que son ejemplos de

aguas potabilizadas residuales y aguas naturales. No se detectó la presencia de MOR en ningún caso, o la cantidad presente de dicho pesticida era inferior al límite de detección del método propuesto. Por ello, se efectuó un estudio de recuperación de MOR en dichas aguas con objeto de comprobar el efecto matriz que pudieran causar las especies químicas presentes en dichas muestras reales.

7.7.1.1. Aguas minerales, río Genil y potable. Estudio de recuperación

Para llevar a cabo este estudio, se realizó la siguiente experiencia: en tres matraces de 50 mL, se prepararon tres disoluciones de MOR de 0,05; 0,1 y 0,2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, manteniendo en cada caso un 10% de etanol y añadiendo agua problema hasta el enrase. A continuación se equilibraron y se efectuaron las medidas de fluorescencia. En todos los casos se usaron tres réplicas para cada muestra. Los valores de intensidades obtenidos se trasladaron a la recta de calibrado establecida a partir de los correspondientes patrones y se evaluó la concentración de analito recuperado de la correspondiente muestra.

Tabla 7.32. Recuperación de MOR en aguas minerales.

Agua	[MOR] _p	[MOR] _{e(m)}	%R(m)	DNR%
Lanjarón	0,05	0,0503	100,5	3.30
	0,10	0,0994	99,4	3.55
	0,20	0,1999	99,9	3.33
Font Vella	0,05	0,0497	99,30	3.55
	0,10	0,1013	101,3	2.45
	0,20	0,2007	100,3	2,25
Fontdor	0,05	0,0489	97,86	2,50
	0,10	0,1025	102,5	2,49
	0,20	0,1997	99,83	1,76
Río Genil	0,05	0,0488	97,6	3.16
	0,10	0,0988	98,8	2.08
	0,20	0,1981	99,1	2.47
Potable	0,05	0,0495	99,00	3,92
	0,10	0,9873	98,73	2,09
	0,20	0,1994	99,70	1,44

m: Media.

[MOR]_p: Puesto en $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

[MOR]_e: Encontrado en $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

R: Recuperación

DNR: Desviación normal relativa

Los resultados obtenidos se resumen en las tablas 7.32. donde se observa en todos los casos una buena recuperación comprendida entre 97,6% y 101,3%.

7.7.1.2. Agua de mar

Para comprobar la exactitud y precisión del método propuesto en su aplicación a agua de mar, se usó la metodología de adición de patrón comentada en el Capítulo 1.

a) Calibrado con patrones

Tras filtrar el agua de mar a través una membrana Millipore de $0,45\mu\text{m}$, en una serie de matraces aforados de 50 mL de capacidad, se colocaron las cantidades de disolución de MOR de $10,0\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ necesarias para obtener unas concentraciones finales de 0,05, 0,1, y $0,2\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. En cada caso se añadió la cantidad de etanol necesario para mantener una proporción del 10% etanol y se enrasaron los matraces con el agua problema. Las disoluciones se agitaron durante 1 min mediante un baño de ultrasonidos y a continuación, se aplicó el procedimiento operativo establecido y se prepararon las habituales réplicas de las muestras. Los resultados obtenidos se recogen en la tabla 7.33

Tabla 7.33. Recuperación de MOR en agua de mar.

$[\text{MOR}]_p$	$[\text{MOR}]_e$	%R(m)	%DNR
0,05	0,0488	97,60	4,37
0,10	0,0979	97,90	2,06
0,20	0,1957	97,85	3,25

$[\text{MOR}]_p$: Puesto en $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

$[\text{MOR}]_e$: Encontrado en $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

R: Recuperación

DNR: Desviación normal relativa

Los valores presentados en esta tabla son resultados de tres replicas de cada muestra.

Como podemos observar en la tabla anterior el porcentaje de recuperación en los tres casos estudiados no difiere significativamente del 100%. No obstante, para asegurarnos de la ausencia de efecto matriz en este tipo de agua, procedimos

a efectuar dos nuevas recuperaciones del analito a dos concentraciones diferentes (0,05 y 0,1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) a partir de agua de mar, operando en la forma que describimos a continuación.

Calibrado con adición de patrón (AC, AC1).

En el primer caso (con 0,05 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, AC) se preparó una disolución de agua de mar, colocando 1,0 mL de disolución patrón de MOR de 12,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de concentración en un matraz aforado de 50 mL de capacidad y se enrasó con agua de mar. De esta disolución se tomaron alícuotas de 10 mL y se colocaron en matraces de 50 mL de capacidad, añadiendo a continuación 0, 0,05, 0,10 y 0,15 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de patrón de MOR y enrasando con agua, manteniendo en todo caso la proporción de etanol adecuada. Para el segundo caso (con 0,1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, AC1), se partió de 2,0 mL de disolución de MOR de 12,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ se colocaron en un matraz de 50 mL y se enrasó con agua de mar. De esta disolución se tomaron alícuotas de 10,0 mL, se colocaron en matraces de 50 mL y añadiendo a continuación 0, 0,050, 0,025 y 0,100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de patrón de MOR y se procedió como en el caso anterior. Los resultados obtenidos figuran en las tablas 7.34 y 7.35 y en las figuras 7.14 y 7.15.

Figura 7.14 Calibrado (AC).

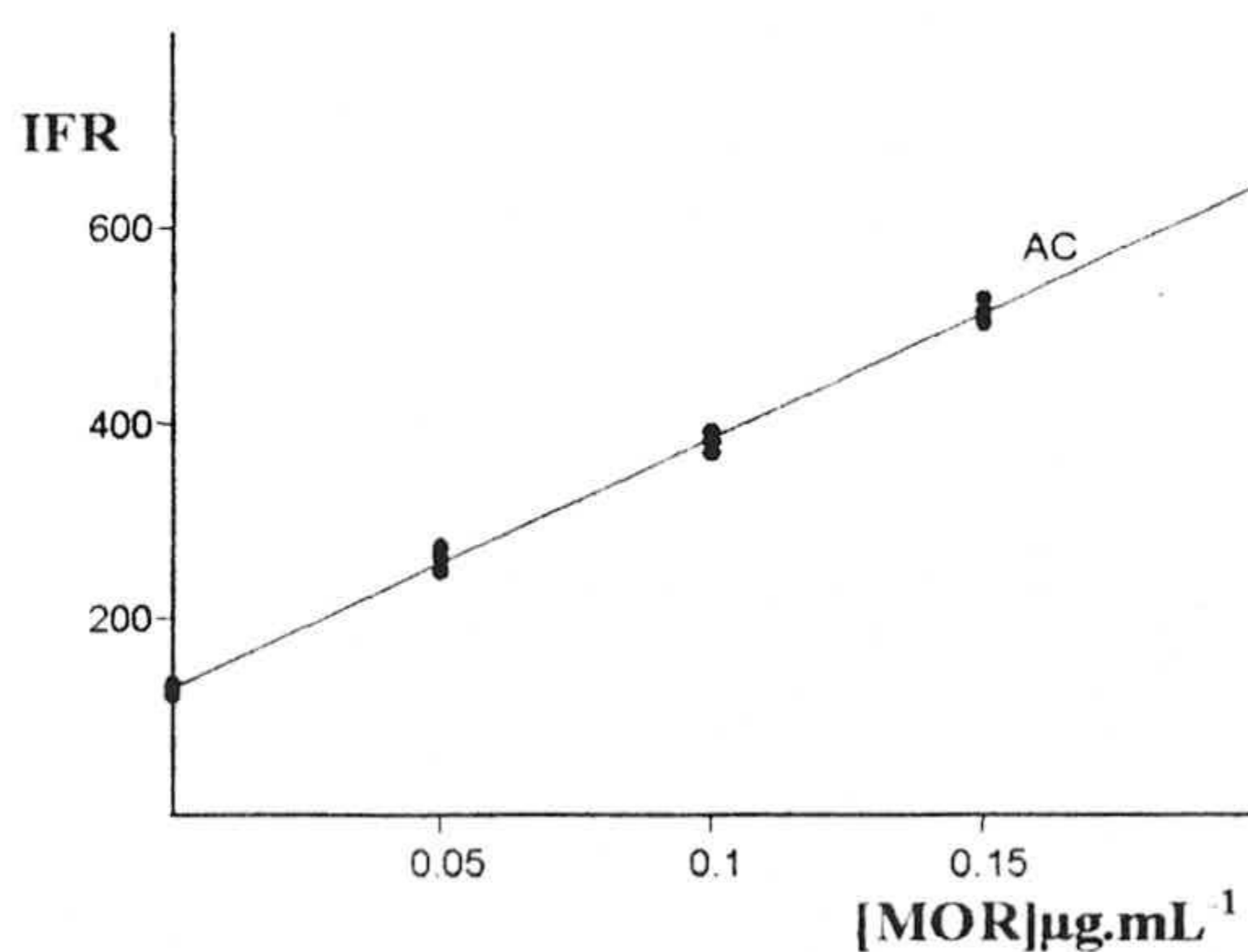


Tabla 7.34 Concentración de MOR (0.05 $\mu\text{g.mL}^{-1}$)

[MOR] añadido	IRF (tres réplicas)		
	0,00	132,7	127,7
0,05	248,7	273,8	261,8
0,10	382,1	370,3	391,3
0,15	527,9	513,1	503,9

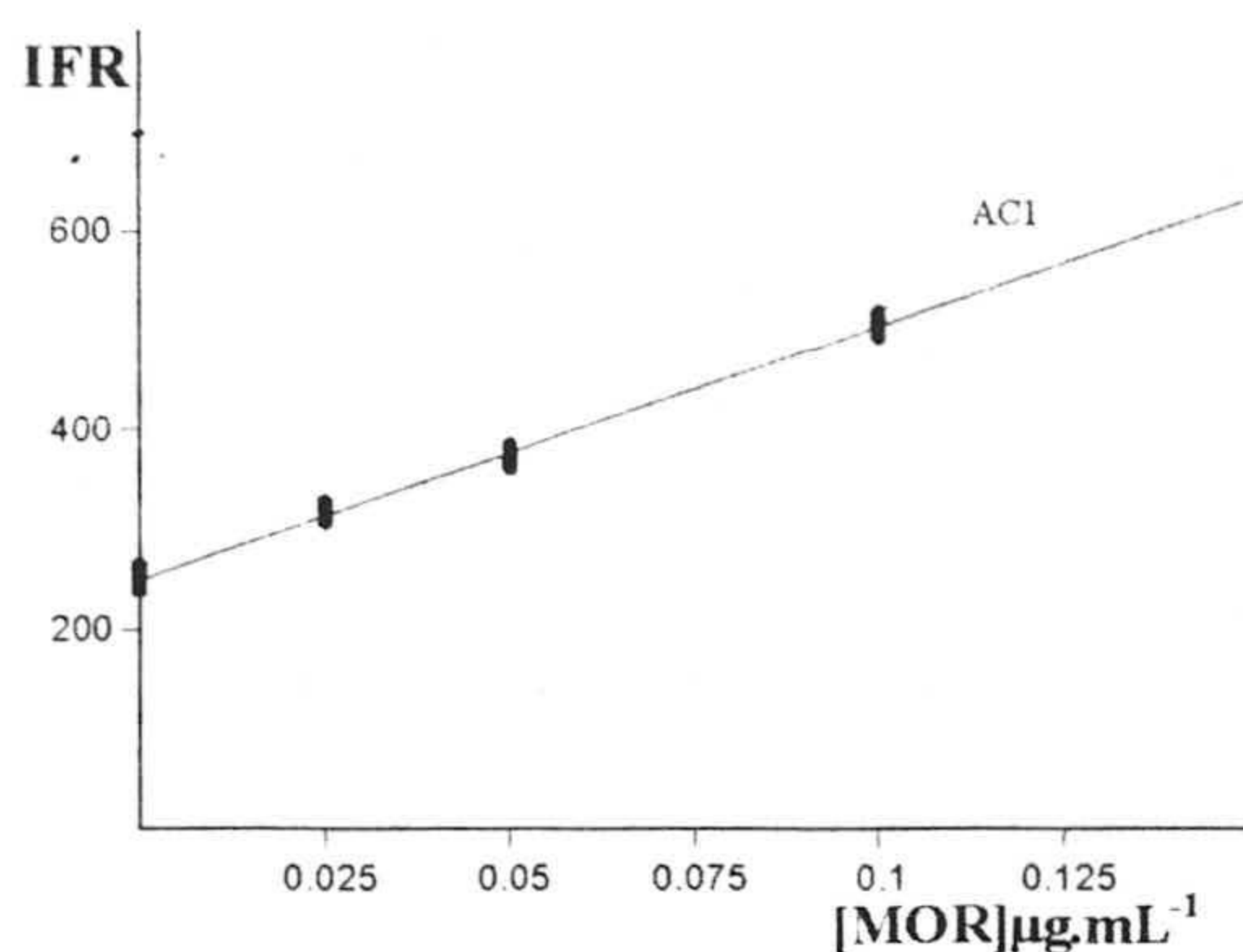


Tabla 7.35. Concentración de MOR (0,10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$)

[MOR] añadido	IRF (tres réplicas)		
	0,000	263,6	247,4
0,025	326,9	309,7	319,6
0,050	382,9	371,7	394,2
0,100	528,8	508,8	513,2

Realizado sobre cantidades crecientes de muestra preparada de la misma manera que se ha mencionado anteriormente en el párrafo de adición de patrón. Para ello se prepararon 4 matraces de 50 mL de capacidad, introduciendo distintas porciones de muestra a analizar (5, 10, 15 y 20 mL) y enrasando a 50 mL con agua destilada.

Tras aplicar el procedimiento operatorio propuesto para preparar la muestra, se midieron las intensidades de fosforescencia transmitida. Los resultados obtenidos se recogen en la tabla 7.36 y se representan en figura 7.16.

Figura 7.16. Calibrado de Youden YC, agua de mar (Motril).

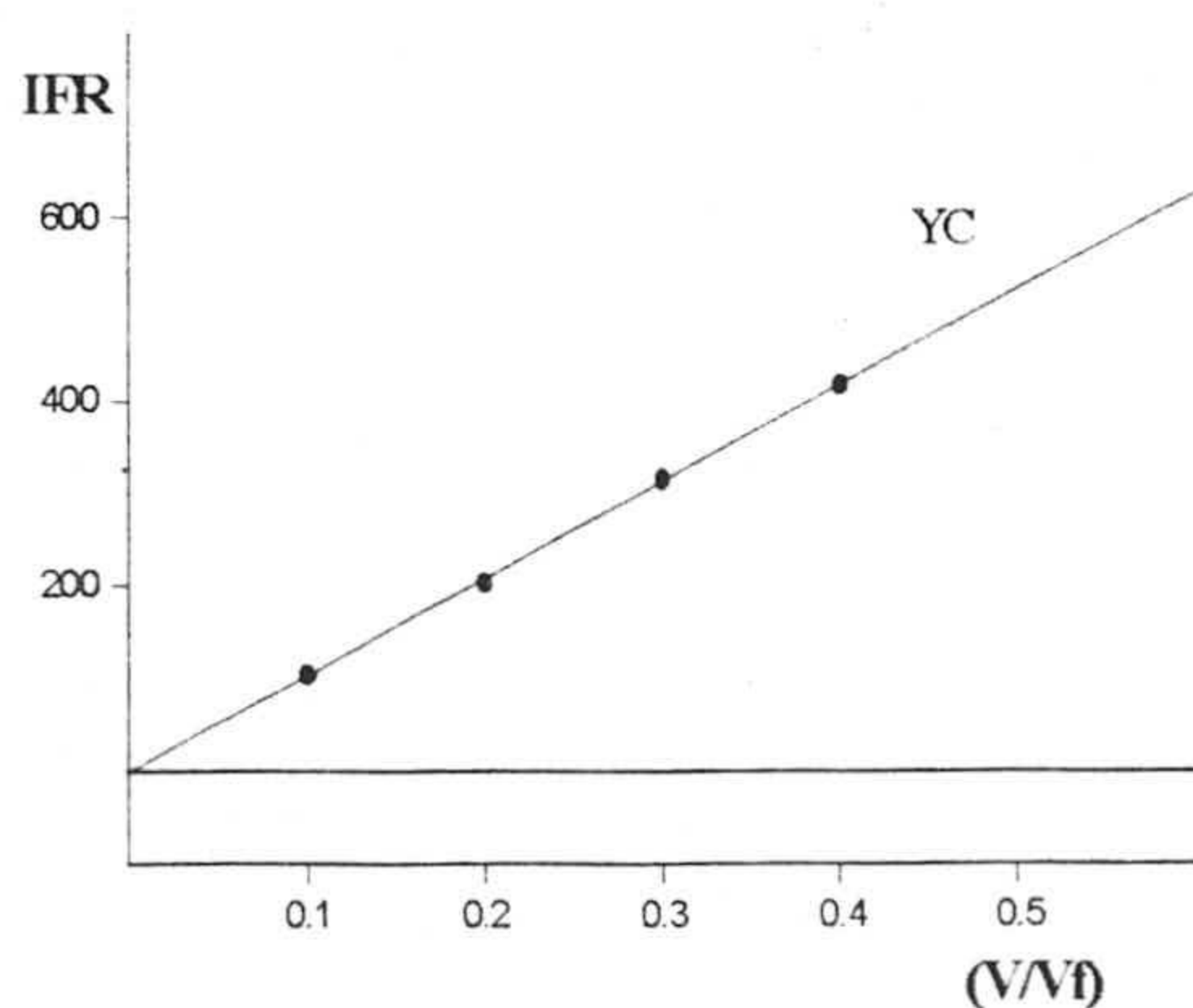


Tabla 7.36.

V/V _r	IFR
0,10	104,3
0,20	209,0
0,30	315,0
0,40	417,1

Los parámetros estadísticos correspondientes a las ecuaciones de las rectas de calibrado, SC, AC, y YC se resumen en la tabla 7.37.

Tabla 7.37. Valores numéricos de los parámetros correspondientes a las rectas SC, AC y YC. Agua de mar.

Parámetros	SC	AC	AC ₁	YC
n	21	12	12	4
a	1,97	128,85	257,13	0,30
b	2575,9	2565,3	2577,1	1044
S _{x,y}	7,71	10,05	10,06	1,27
R ²	0,999	0,998	0,996	0,999
% P _{x,y}	91,83	60,45	63,2

De los resultados obtenidos se observa que hay buen ajuste del modelo de regresión lineal para los tres calibrados, ya que $P > 5\%$.

A partir de estos datos se aplica el procedimiento estadístico para llevar acabo la validación del método analítico en la determinación del analito en agua de mar tomado en el puerto de Motril.

Resultados del criterio de validación por adición de patrón

Comparación de pendientes. Los resultados de test de comprobación de las pendientes se resumen en la tabla 7.32.

Tabla. 7.38. Resultados de la comparación de los calibrados SC, AC y AC₁.

Parámetros	Valores
S _p (1)	8,589
S _p	8,637
t(b) ₁	0,0006 (P = 99,95)
t(b)	0,197 (P = 84,52)
b _p (1)	2572,3
b _p	2575,9
BY(1)	-1,931
BY	-1,671

Se comprobó que el valor del estadístico test t de Student calculado $t(b)$ es menor que el valor t tabulado a un nivel de significación del 95% para $(n_{SC} + n_{AC} - 4)$, y $(n_{SC} + n_{AC1} - 4)$ grados de libertad. Por tanto no hay diferencia significativa entre ambas pendientes en todos los casos. Pudiéndose estimar un valor promedio b_p entre las pendientes de ambos calibrados para seguir con la validación del método.

Calculo de la ordenada en el origen. Blanco de Youden

Los nuevos valores de \hat{a} , \hat{a}_A , a_S (ordenadas en el origen para los calibrados AC, AC₁ y SC respectivamente) y del intervalo de confianza del calibrado con patrones, obtenidos mediante la utilización de los valores de pendiente promedio b_p , desviación estándar promedio S_p y t de Student con $(n_S - 2)$ grados de libertad para un nivel de confianza del 95% se recogen en la Tabla 7.39.

Tabla 7.39. Nuevas ordenadas en el origen e intervalo de confianza sobre a_S .

Parámetros	SC	AC
a'	2,231	128,1
Intervalo de confianza sobre a_S	[-3,998; 8,46]	
a_Y	1,453	
Parámetros	AC	AC1
a'	1,97	257,1
Intervalo de confianza sobre a_S	[-4,22; 8,16]	
a_Y	1,44	

A vista de los resultados obtenidos, se deduce que el blanco de Youden del agua de mar está incluido en su correspondiente intervalo de confianza.

Comprobación de la exactitud.

Se llevó a cabo comparando el contenido de la muestra utilizando directamente la recta de calibrado con patrones y mediante el calibrado con adición de patrones. Esta comparación se realizó mediante el cálculo del estadístico $t(c)$. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 7.40.

Tabla 7.40. Comparación de la exactitud.

Parámetros	SC	AC
$C_{X,S}$	0,0515
$C_{X,A}$	0,0498
$t(c)$	1,299(P=20,39) valor critico 2,042 (5%)	
Parámetros	SC	AC1
$C_{X,S}$	0,1022
$C_{X,A}$	0,997
$t(c)$	1,751(P=9,03) valor critico 2,042 (5%)	

A partir de los resultados obtenidos en la tabla anterior se observó que no existe discrepancia entre ellos. No hay diferencia significativa entre los contenidos calculados, ya que $t(c)_{cal} < t(c)_{tab}$ para $(n_{SC} + n_{AC} - 3)$ grado de libertad, se acepta que el método es exacto, con un valor P mayor del 5% a un nivel de confianza del 95%.

7.7.1.3. Aplicación a aguas residuales de la EDAR del Centro Penitenciario de Albolote (Granada).

Estudio de recuperación en agua residual

a). Calibrado con patrones

Se filtran las aguas residuales de la estación depuradora de aguas residuales (EDAR) del Centro Penitenciario de Albolote para eliminar el material exis-

tente en suspensión, a través una membrana Millipore de 0,45 μm . En una serie de matraces aforados de 50 mL de capacidad, se colocaron unas cantidades de disolución de MOR de 10,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ necesarias para obtener las concentraciones finales de 0,05, 0,1, y 0,2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Se añadió la cantidad de etanol necesario en cada caso para mantener la proporción del 10% de etanol y se enrasaron con agua de la EDAR de Albolote. Las disoluciones se agitaron durante 1 min mediante un baño de ultrasonidos y a continuación, se aplicó el procedimiento operatorio establecido y se prepararon las respectivas réplicas de las muestras. Los resultados obtenidos se recogen en la tabla 7.41.

7.7.1.3.1. Agua de entrada de la EDAR del Centro Penitenciario de Albolote

Tabla 7.41. Recuperación de MOR en agua residual de entrada del (Centro Penitenciario Albolote).

$[\text{MOR}]_p$	$[\text{MOR}]_e$	R % (m)	%DNR
0,05	0,0432	86,4	6,21
0,10	0,0906	90,6	3,00
0,20	0,184	92,0	2,50

No obstante los resultados y para asegurarnos de la ausencia de efecto matriz en este tipo de agua, procedimos a efectuar dos nuevas recuperaciones del analito a dos concentraciones diferentes (0,05 y 0,1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) a partir de agua residual, operando en la forma que describimos a continuación.

b). Recuperación mediante el calibrado con adición de patrón (agua de entrada)

En el primer caso (con 0,05 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, AC) se preparó una disolución de agua residual colocando 1,0 mL de disolución patrón de MOR de 12,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de concentración en un matraz aforado de 50 mL de capacidad y se enrasó con agua residual. De esta disolución se tomaron alícuotas de 10 mL y se colocaron en ma-

traces de 50 mL de capacidad, añadiendo a continuación 0, 0,05, 0,10 y 0,15 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ del patrón de MOR, enrasando con agua y manteniendo, en todo caso, la proporción de etanol adecuada. Para el segundo caso (con 0,1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, AC1) se partió de 2,0 mL de disolución de MOR de 12,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, se colocaron en un matraz de 50 mL y se enrasó con agua residual. De esta disolución se tomaron alícuotas de 10,0 mL, se colocaron en matraces de 50 mL y añadiendo a continuación 0, 0,050, 0,025 y 0,100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de patrón de MOR y se procedió como en el caso anterior. Los resultados obtenidos de las señales de fosforescencia transmitida se recogen en la tabla 7.42 y 7.43 y se representan en figura 7.17 y 7.18 respectivamente.

Figura 7.17. Calibrado (AC).

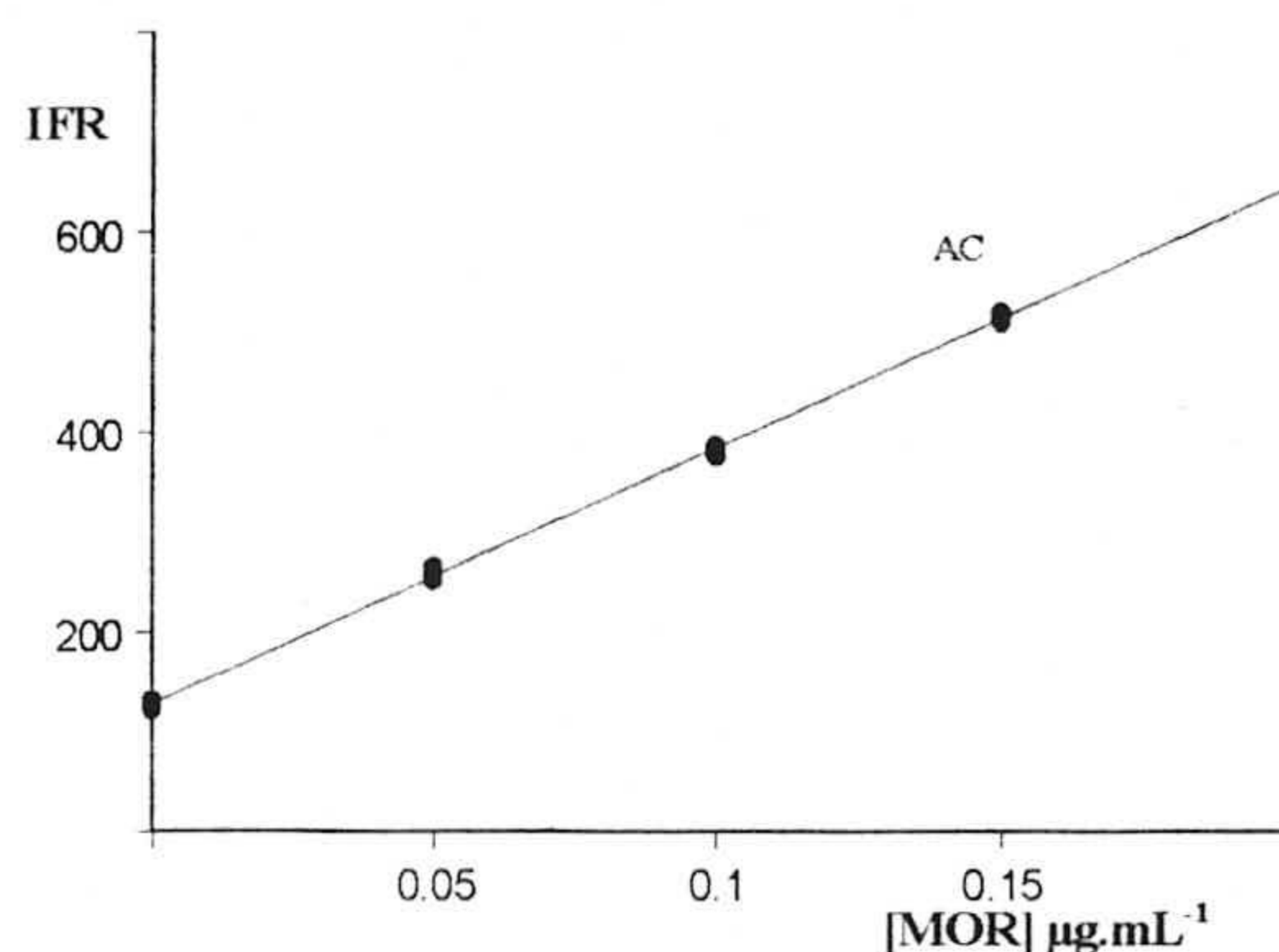


Tabla 7.42. Concentración MOR 0,05 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

[MOR] añadido	IRF (tres réplicas)		
0,00	130,3	126,9	121,6
0,05	259,8	265,3	251,9
0,10	380,1	375,5	386,3
0,15	510,9	520,3	516,8

Figura 7.18. Calibrado (AC1).

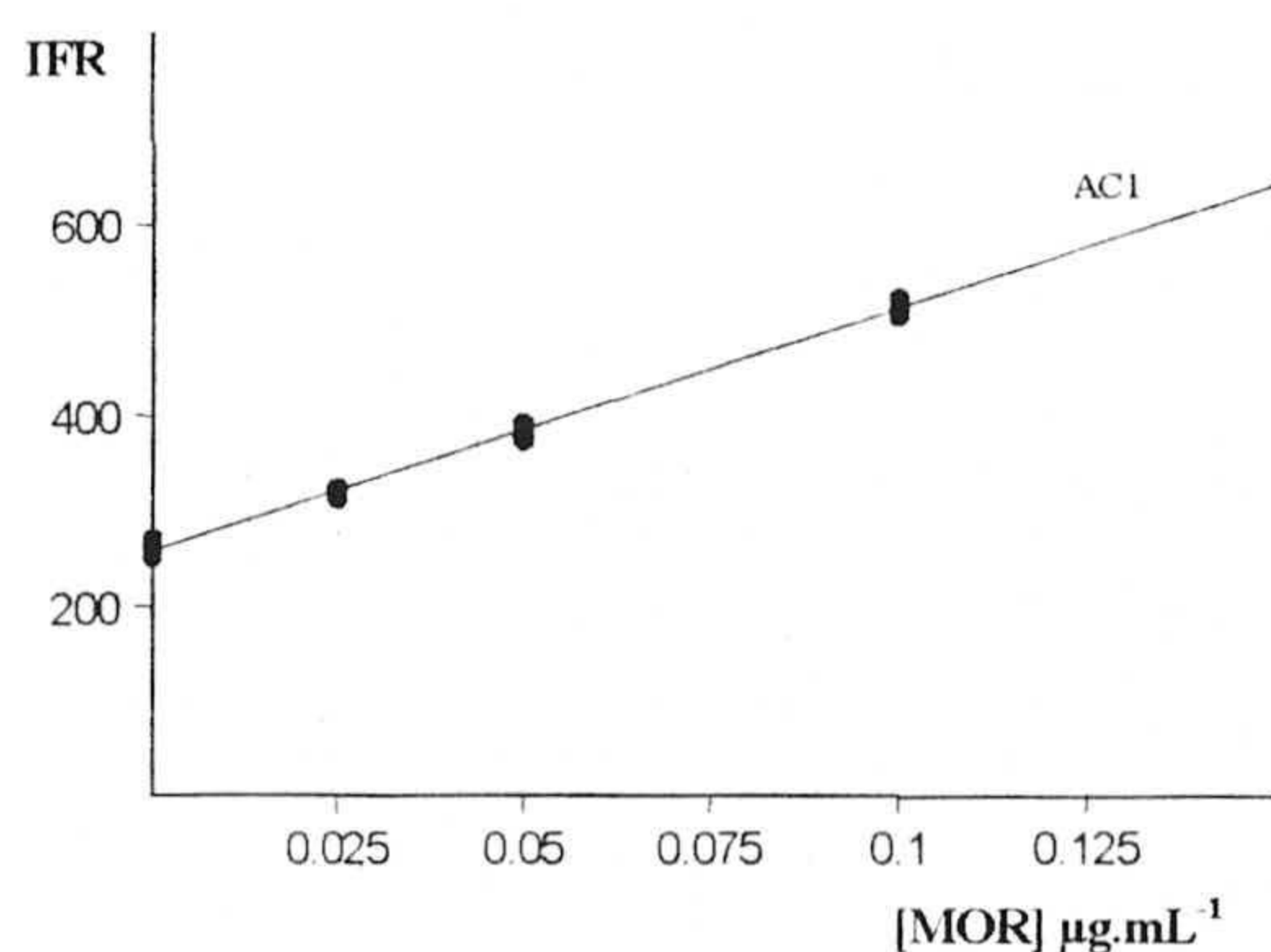


Tabla 7.43. Concentración MOR 0,10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

[MOR] añadido	IRF (tres réplicas)		
0,000	261,7	250,4	270,2
0,025	323,9	312,7	320,9
0,050	380,2	374,2	393,2
0,100	524,2	517,0	505,0

Calibrado de Youden

. -Para llevar a cabo la validación de método propuesto por nosotros, hemos realizado sobre cantidades crecientes de muestra problema el calibrado de Youden. Para ello se prepararon 4 matraces de 50 mL de capacidad, introduciendo distintas porciones de muestra a analizar (5, 10, 15 y 20 mL) y enrasando a 50 mL con agua destilada. Tras aplicar el procedimiento operatorio propuesto anteriormente para preparar la muestra, se midieron las intensidades de fosforescencia transmitida Los resultados obtenidos se recogen en la tabla 7.44, y se representan en la figura 7.19.

Figura 7.19. Calibrado de Youden YC,

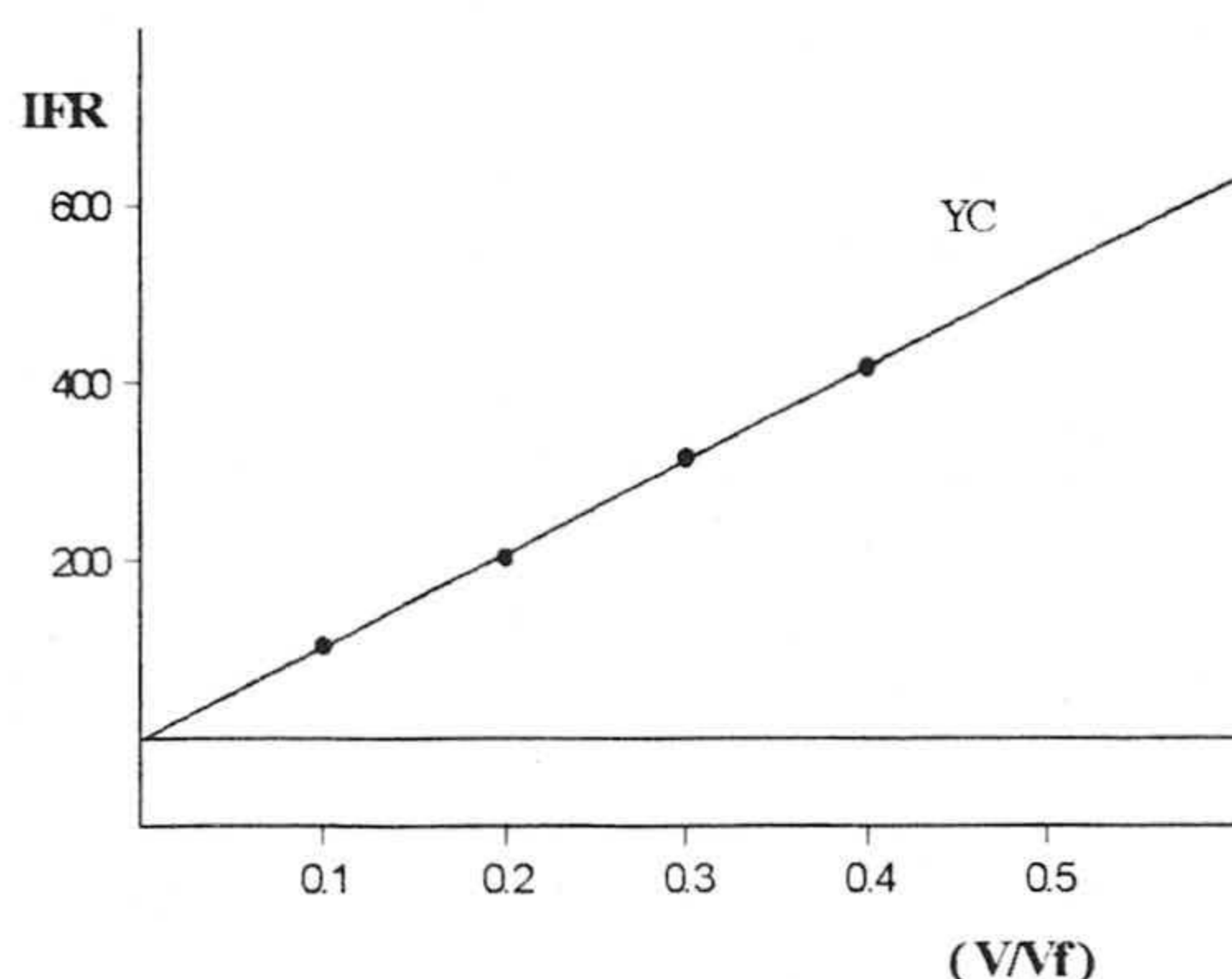


Tabla 7.44.

V/V _r	IFR
0,10	105,3
0,20	210,0
0,30	313,3
0,40	418,2

Tabla 7.45. Valores numéricos de los parámetros correspondientes a las rectas SC, AC y YC.

Parámetros	SC	AC	AC ₁	YC
n	21	12	12	4
a	1,97	126,85	257,55	1,4
b	2575,9	2581,7	2558,9	1041,3
S _{x,y}	7,71	5,751	8,526	0,414
R ²	0,999	0,999	0,997	0,999
%P _{x,y}	91,83	24,65	60,60

Como se observa, hay buen ajuste del modelo de regresión lineal para los tres calibrados ya que $P > 5\%$.

A partir de estos datos se aplica el procedimiento estadístico para llevar a cabo la validación del método analítico en la determinación del analito en agua residual de entrada del Centro Penitenciario de Albolote.

Resultados del criterio de validación por adición de patrón

Comparación de pendientes.

Los resultados de test de comprobación de las pendientes se resumen en la tabla 7.46.

Tabla 7.46 Resultados de la comparación de los calibrados SC, AC y AC₁.

Parámetros	Valores
S _p	7,1
S _p (1)	8,00
t(b)	0,1286 (P = 89,86)
t(b) ₁	0,2592 (P = 79,73)
b _p	2577,7
b _p (1)	2572,7
BY	-0,430
BY(1)	-0,805

Se comprobó que el valor del estadístico test de Student calculado t(b) es menor que el valor t tabulado a un nivel de significación del 95% para (n_{SC} + n_{AC} - 4) y (n_{SC} + n_{AC1} - 4) grados de libertad, por tanto no hay diferencia significativa entre ambas pendientes en todos los casos. Pudiéndose estimar un valor promedio b_p entre las pendientes de ambos calibrados para continuar con la validación del método.

Cálculo de la ordenada en el origen. Blanco de Youden

Usando las ecuaciones indicadas en el Capítulo 1, se pudieron calcular los nuevos valores de á, á_A, á_S, ordenadas en el origen para los calibrados AC, AC₁ y SC respectivamente y el intervalo de confianza del calibrado con patrones, me-

diante la utilización de los valores de pendiente promedio b_p , desviación estándar promedio S_p y t de Student con $(n_s - 2)$ grados de libertad para un nivel de confianza del 95%. Los resultados obtenidos se recogen en la tabla 7.47.

Tabla 7.47. Nuevas ordenadas en el origen e intervalo de confianza sobre a_s .

Parámetros	SC	AC
a'	1,83	127,14
Intervalo de confianza sobre a_s	[-3,29; 6,95]	
a_Y	1,40	
Parámetros	AC	AC1
a'	2,205	256,91
Intervalo de confianza sobre a_s	[-3,56; 7,96]	
a_Y	1,40	

A vista de los resultados obtenidos en la tabla 7.47, se comprobó que el blanco de Youden del agua de mar está incluida en su correspondiente intervalo de confianza.

Comprobación de la exactitud:

Se llevó a cabo comparando el contenido en la muestra utilizando directamente la recta de calibrado con patrones y mediante el calibrado con adición de patrones. Esta comparación se llevó a cabo mediante el cálculo del estadístico $t(c)$. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 7.48.

A partir de los resultados obtenidos en la tabla anterior se observa que no existe discrepancia entre ellos. Mediante la comparación pudimos concluir que no hay diferencia significativa entre los contenidos calculados.

Ya que $t(c)_{cal} < t(c)_{tab}$ para $(n_{SC} + n_{AC} - 3)$ grado de libertad, se acepta que el método es exacto con un valor P mayor que el 5% a un nivel de confianza del 95%.

Tabla 7.48. Comparación de la exactitud.

Parámetros	SC	AC
$C_{X,S}$	0,0500
$C_{X,A}$	0,0488
t(c)	1,136 (P = 26,50) valor critico 2,042(5%)	
Parámetros	SC	AC1
$C_{X,S}$	0,0970
$C_{X,A}$	0,0993
t(c)	1,895 (P = 6,8) valor critico 2,042(5%)	

7.7.1.3.2. Agua de salida de la EDAR del Centro Penitenciario de Albolote

Estudio de Recuperación

a) Recta de calibrado con patrones

La tabla 7.49 muestra los resultados obtenidos trabajando como en el caso anterior

Tabla 7.49. Recuperación de MOR en agua residual de salida del(centro Penitenciario Albolote).

$[MOR]_p$	$[MOR]_e$	%R(m)	%DNR
0,05	0,04840	96,80	2,38
0,10	0,09817	98,17	2,76
0,20	0,19800	98,98	2,72

b). Calibrado con adición de patrón agua de salida EDAR.

De la misma manera explicada en el apartado anterior sobre el agua de entrada hemos aplicado el protocolo de adición de patrón sobre dos muestras de agua residuales de salida con concentraciones diferentes 0,05 y 0,1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

El método se realizó por triplicado para la obtención de las curvas de calibrado, AC, y AC₁. Los resultados obtenidos de las señales de fosforescencia transmitida se recogen en las tablas 7.50 y se representan en las figuras 7.20, y 7.21.

Figura 7.20. Calibrado (AC).

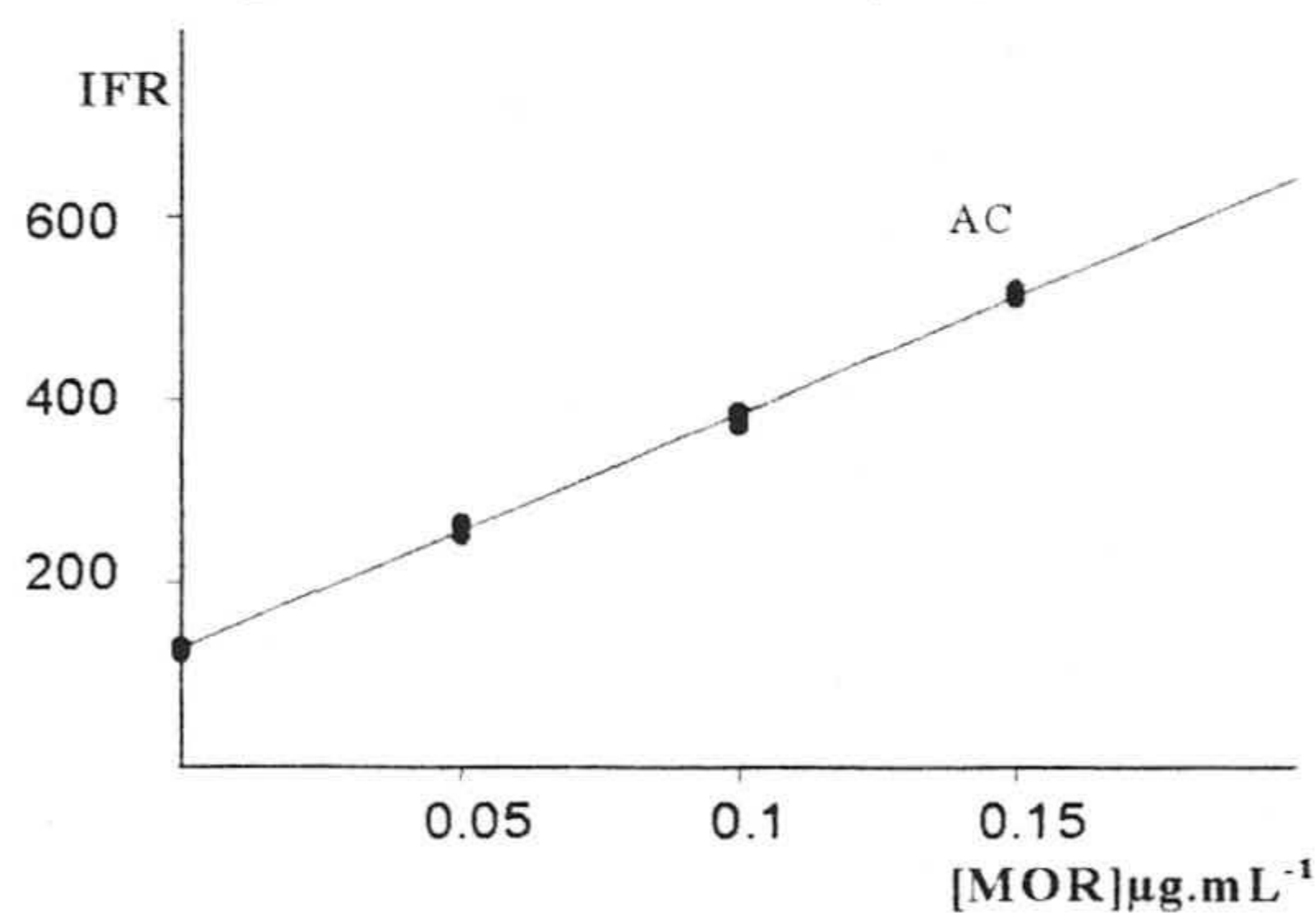


Tabla 7.50. Concentración MOR (0,05 µg.mL⁻¹).

[MOR] µg.mL ⁻¹	IRF (tres réplicas)		
0,00	131,4	126,7	121,8
0,05	260,8	266,1	250,4
0,10	382,1	371,9	389,2
0,15	513,9	522,0	511,7

Figura 7.21. Calibrado (AC1).

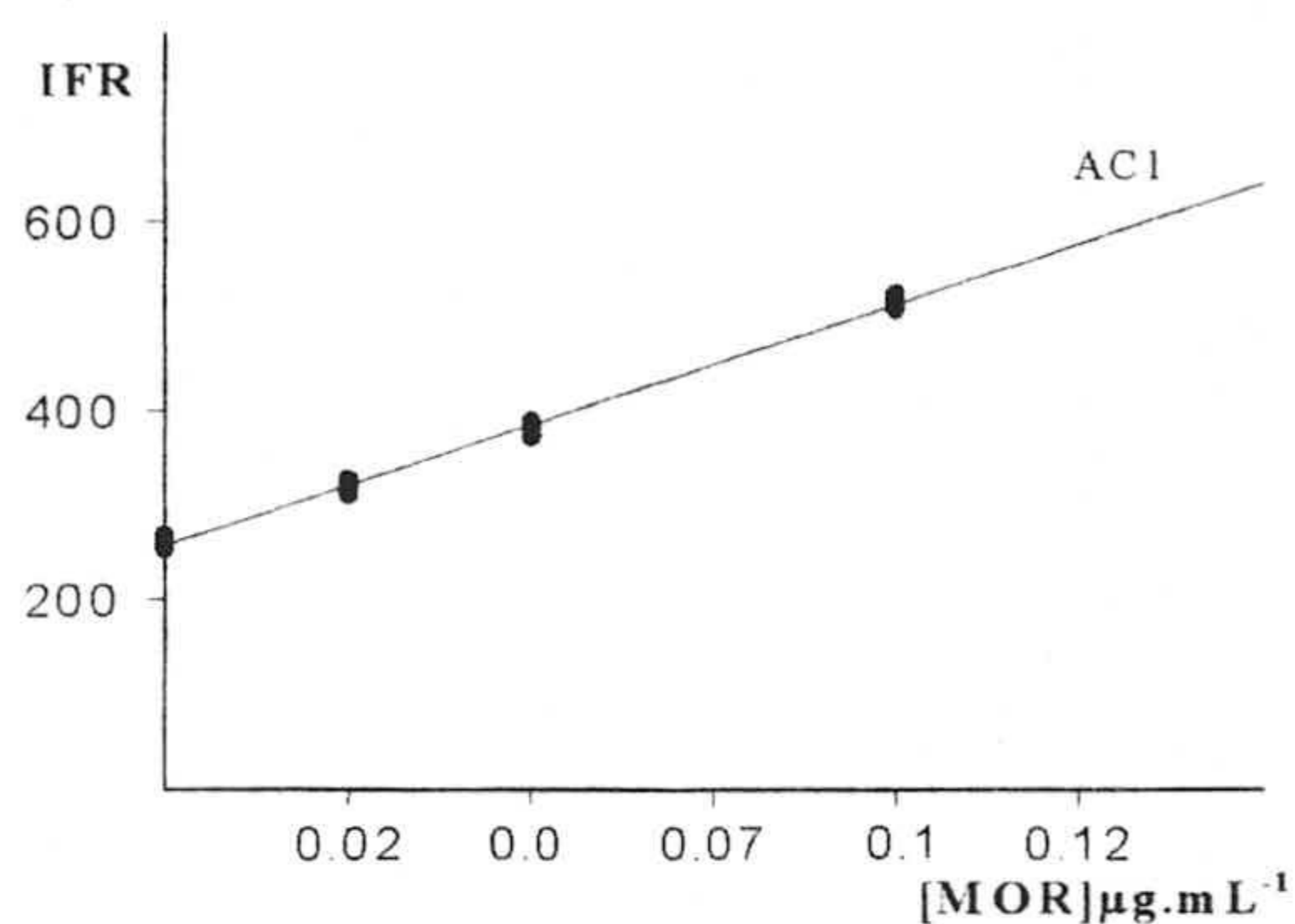


Tabla 7.51. Concentración MOR (0,10 µg.mL⁻¹).

[MOR] añadido	IRF tres réplicas		
0,000	261,7	254,4	266,4
0,025	326,3	311,7	318,8
0,050	389,0	372,3	384,4
0,100	524,3	516,6	509,3

Calibrado de Youden

Los resultados obtenidos se recogen en la tabla 7.52, y se representan en figura 7.22.

Figura 7.22. Calibrado de Youden YC.

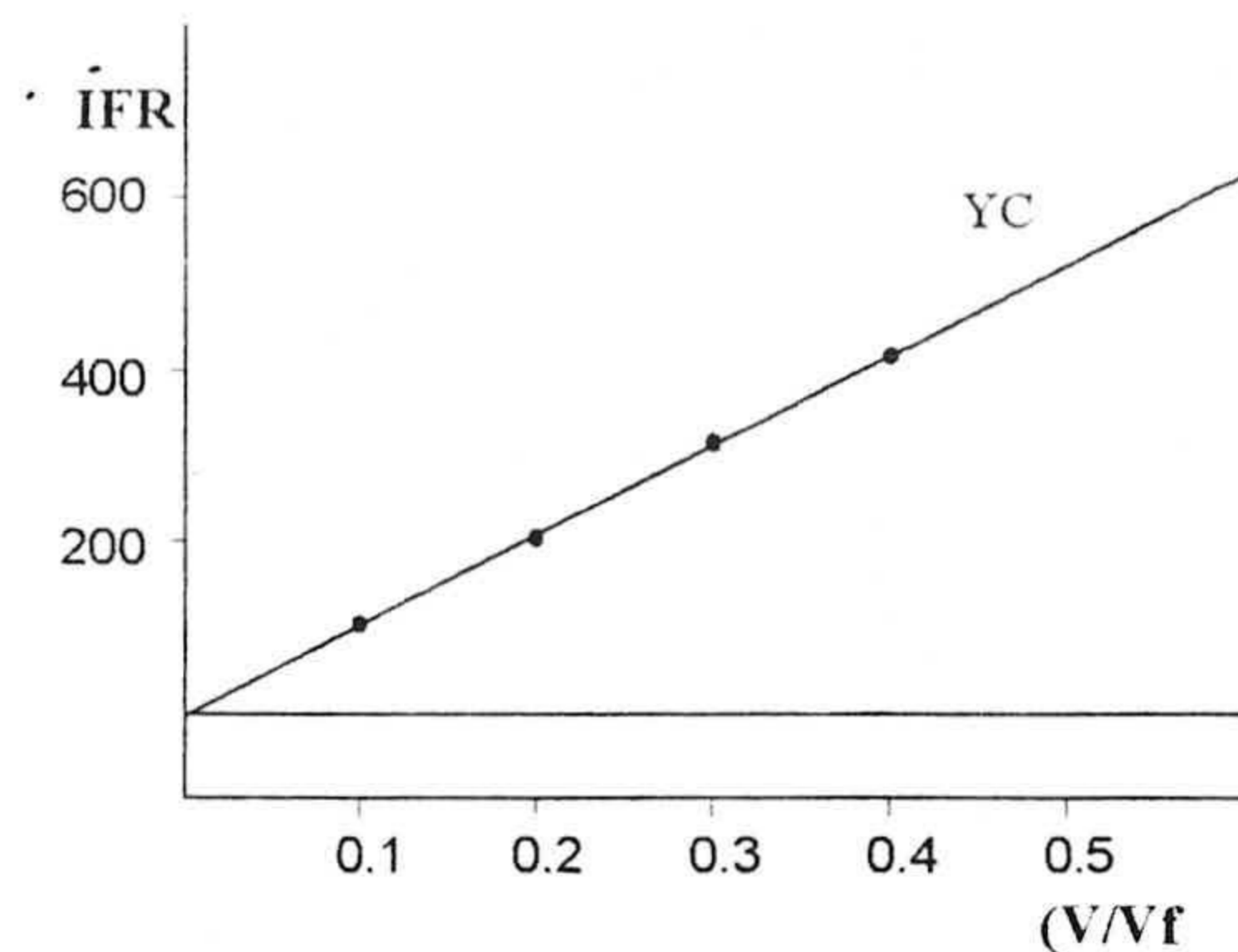


Tabla 7.52.

V/V _f	IFR
0,10	106,5
0,20	211,7
0,30	314,3
0,40	417,6

Los parámetros estadísticos correspondientes a las ecuaciones de las rectas de calibrado, SC, AC, y YC se resumen en la tabla 7.53.

Tabla 7.53. Valores numéricos de las parámetros correspondientes a las rectas SC, AC y YC.

Parámetros	SC	AC	AC ₁	YC
n	21	12	12	4
a	1,97	127,28	257,17	3,55
b	2575,89	2579,0	2570,48	1035,9
S _{x,y}	7,71	6,81	7,54	0,851
R	0,999	0,999	0,998	0,999
% P _{x,y}	91,83	42,78	37,54

De los resultados obtenidos se observa que hay buen ajuste del modelo de regresión lineal para los tres calibrados ya que $P > 5$.

A partir de estos datos se aplica el procedimiento estadístico para llevar a cabo la validación del método analítico en la determinación de MOR en el agua residual de salida de la EDAR del Centro Penitenciario de Albolote.

Resultados del criterio de validación por adición de patrón

Comparación de pendientes.

Los resultados de test de comprobación de las pendientes se resumen en la tabla 7.54.

Tabla 7.54. Resultados de la comparación de los calibrados SC, AC y AC₁.

Parámetros	Valores
S_p	7,41
$S_p(1)$	7,65
$t(b)$	0,0662 (P =94,77)
$t(b)_1$	0,0821 (P =93,51)
b_p	2576,93
$b_p(1)$	2574,92
BY	1,655
BY(1)	1,508

Se comprobó que el valor del estadístico test de Student calculado $t(b)$ es menor que el valor t tabulado a un nivel de significación del 95% para $(n_{SC} + n_{AC} - 4)$, y $(n_{SC} + n_{AC1} - 4)$ grados de libertad. Por tanto no hay diferencia significativa entre ambas pendientes en todos los casos. Se puede estimar un valor promedio b_p entre las pendientes de ambos calibrados para continuar con la convalidación del método.

Cálculo de la ordenada en el origen. Blanco de Youden. Los resultados obtenidos se recogen en la tabla 7.55.

Tabla 7.55. Nuevas ordenadas en el origen e intervalo de confianza sobre a_s .

Parámetros	SC	AC
a'	1,895	127,4
Intervalo de confianza sobre a_s	[-3,45; 7,24]	
a_Y	3,55	
Parámetros	SC	AC1
a'	4,08	135,79
Intervalo de confianza sobre a_s	[-1,43; 9,59]	
a_Y	3,55	

A vista de los resultados obtenidos en la tabla 7.55, se comprobó que el blanco de Youden del agua residual está incluido en su correspondiente intervalo de confianza.

Comprobación de la exactitud

Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 7.56.

Tabla 7.56. Comparación de la exactitud.

Parámetros	SC	AC
$C_{X,S}$	0,0496
$C_{X,A}$	0,0481
t(c)	1,362 (P = 18,34) valor critico 2,042 (5%)	
Parámetros	SC	AC1
$C_{X,S}$	0,0974
$C_{X,A}$	0,0984
t(c)	0,782 (P = 44,02) valor critico 2,042 (5%)	

Como podemos ver no existe discrepancia entre los resultados. Mediante la comparación podemos concluir que no hay diferencia significativa entre los contenidos calculados. Ya que $t(c)_{cal} < t(c)_{tab}$ para $(n_{SC} + n_{AC} - 3)$ grado de libertad se acepta que el método es exacto con un valor P mayor del 5% a un nivel de confianza del 95%. Como conclusión vemos que es posible usar el sensor de un solo uso propuesto para la determinación de MOR con unos resultados exactos precisos en sus aplicaciones en aguas tanto naturales como residuales.

En la presente Memoria hemos estudiado la fosforescencia del pesticida MOR en dos tipos de soporte sólido papel de filtro Whatman W4 y membrana sensora fijada a un soporte sólido plástico de poliéster tipo Mylar (politereftalato de etilo) encontrando que, en los dos casos, no hay influencia significativa del átomo pesado sobre la intensidad de fosforescencia .

Resumiendo los los resultados analíticos de los métodos propuestos, hemos encontrado que en el papel, los límites de detección y cuantificación son $6,2 \mu\text{g. L}^{-1}$ y $21 \mu\text{g. L}^{-1}$, respectivamente y la sensibilidad del calibrado es $120,3 (\mu\text{g/mL})^{-1}$, y en el segundo caso, en la membrana sensora, hemos encontrado que estos límites son $0,3 \mu\text{g.L}^{-1}$ y $0,92 \mu\text{g.L}^{-1}$ respectivamente y la sensibilidad del calibrado es $2575,9 (\mu\text{g/mL})^{-1}$.

Esto es, mediante el empleo del sensor de un solo uso el límite de detección es 20 veces menor y la sensibilidad alrededor de 20 veces mayor que en el método sobre papel, pues el sensor realiza una preconcentración efectiva de mostrestan.

Como resultado de los estudios realizados se ha enviado un artículo denominado: Determination of the Pesticide Mostrestan Residues by means of a single-use Phosphorimetric Sensor por L. F. Capitán-Vallvey, M. K. Deheidel, M. D. Fernández and R. Avidad, en la revista *Analytical Chemistry*, del que hemos incluido una copia en el Apéndice nº 6 de esta Memoria.

Bibliografía

1. F. Erewé y H. Kaspers, *Pflanzenschutz - Nachrichten.*, 18, 1 (1965).
2. Z. Li, X. Li, S. Petrovic y J. Marrison., *Anal. Chem.*, 68, 1717-1725 (1996).
3. Z. Li, X. Li, S. Petrovic y J. Marrison., *Anal. Chem.*, 68, 1726-1734 (1996).

CONCLUSIONES

Como resultado del trabajo realizado en la presente Memoria podemos enunciar las siguientes conclusiones:

1. Se ha simplificado la metodología de medida de fosforescencia en fase sólida, usando papel como soporte sólido, mediante la combinación de secado con aire caliente del sistema muestra – soporte y el uso de láminas de cuarzo que protegen dicho sistema en el momento de la medida.
2. Se ha aumentado la precisión de las medidas de fosforescencia en fase sólida sobre papel empleando como señal analítica la fosforescencia transmitida en vez de la habitual reflejada. Para ello se ha diseñado un dispositivo portamuestras que facilita dicha medida.
3. Con la metodología puesta a punto se ha conseguido desarrollar métodos de análisis para la determinación de pesticidas (tiabendazol, carbaril, morestan, y warfarina) al nivel de trazas, tanto individualmente como en mezclas de ellos, en diferentes matrices (aguas, suero sanguíneo y productos hortofrutícolas) usando diferentes técnicas de calibrado.
4. Se ha desarrollado un sensor de un solo uso, basado en la medida de fosforescencia transmitida para la determinación del pesticida morestan, que permite una mayor simplificación del procedimiento analítico previo a la medida. Basta con sumergir el sensor en la disolución problema durante un cierto tiempo, para que se produzca una preconcentración de analito en el mismo, a través de un proceso de reparto, aumentando así la sensibilidad del método en más de un orden de magnitud.

APÉNDICE N° 1

Titulo: Determination of Thiabendazole in Foods and Water by Solid-Phase Transmitted Room - Temperature Phosphorescence.

Autores: L. F. Capitán-Vallvey, M. K. Deheidel, and Ramiro Avidad.

Revista: Mikrochim. Acta 130, 273-279 (1999).

Determination of Thiabendazole in Foods and Waters by Solid-Phase Transmitted Room-Temperature Phosphorescence

L. F. Capitán-Vallvey¹, Mahmoud K. Deheid², and Ramiro Avidad^{1*}

¹ Department of Analytical Chemistry, University of Granada, E-18071 Granada, Spain

² Department of Chemistry, University of Hebron (Palestine)

Abstract. A new method for the determination of thiabendazole (TBZ) is proposed, based on enhanced native phosphorescence at room temperature when the pesticide is fixed on paper and using Pb(CH₃-COO)₂ as the enhancer. The sample and enhancer solutions were deposited on a slip of paper (Whatman No. 4), previously humidified with pH 4.0 acetic/acetate buffer solution, after which the paper was dried and placed between two quartz plates. The diffuse transmitted phosphorescence intensity was measured directly at $\lambda_{\text{ex}} = 303 \text{ nm}$ and $\lambda_{\text{em}} = 472 \text{ nm}$. The applicable concentration range was 160.0–1200.0 ng/ml, with a relative standard deviation of 1.2%. The detection and quantification limits were 47.7 and 158.9 ng/ml, respectively. This simple method was used to measure the levels of this pesticide in potatoes, green beans, lettuce and different types of waters, showing good selectivity in all instances.

Key words: room temperature phosphorescence, thiabendazole determination, waters analysis, foods analysis.

Room-temperature phosphorescence on solid substrates is a most useful analytical technique for developing sensitive and selective methods of measuring trace amounts of organic compounds [1–2]. The technique, described by Roth in 1967 [3], allows various compounds to be measured, including substances of biological and pharmaceutical interest, pesticides and polycyclic aromatic hydrocarbons. The methodology employed is based on measuring the phosphorescence intensity emitted by the phosphor in

solid phase, if the phosphor is fixed in a solid support [4–8], or in solution, either by forming an inclusion complex with a cyclodextrin [9–10] or, more recently, by using micellar-stabilised media [11–13].

The main drawbacks of using solid supports (e.g., filter paper, silica, alumina and asbestos) are that the background signal produced by the substrate may be significant with respect to the signal produced by the analyte, and the quenching effect produced by the moisture and atmospheric oxygen. Consequently, the applications of this technique for trace analysis can be somewhat limited.

At present, the most commonly used ways of avoiding such negative effects are (i) by means of a dry atmosphere of N₂ (or another inert gas) in the sample compartment when the measurements of phosphorescence are performed in solid phase [14], and (ii) in the case of solutions, by adding sulphite [15].

In this paper a method of measuring phosphorescence in solid phase by using filter paper as the solid support is proposed. To increase the precision of the method and diminish the quenching produced by the atmospheric oxygen, we simultaneously tested two modifications to measure the phosphorescence intensity: (i) placing the paper with the sample between two quartz plates to diminish the quenching of the atmospheric oxygen during the measurement; and (ii) using a home-made accessory that enables the sample volume to be deposited on the same point of the paper strips. With these two modifications, and by measuring the transmitted phosphorescence intensity instead of following the normal procedure of measuring the reflected phosphorescence, we found a selective, simple, quick and inexpensive method for the

* To whom correspondence should be addressed

determination of thiabendazole (TBZ). The method was applied to the determination of the pesticide in waters of diverse provenance and foods such as potatoes, green beans or lettuces.

Experimental

Apparatus and Software

All phosphorescence measurements were performed with a Perkin-Elmer LS-50 luminescence spectrometer working in the phosphorescence mode. The spectrometer, equipped with a Hamamatsu R298 photomultiplier, two Monk-Gillieson F/3 monochromators, and a xenon discharge lamp with a power equivalent to 20 kW during 8 μ s and with a pulse width at half peak height < 10 μ s, was interfaced to a PS/230-386 microcomputer. The Perkin-Elmer FL Data Manager software package was used for spectral acquisition and manipulation of the data. In order to check the spectrometer a P1 standard (12.5 \times 12.5 \times 45 mm, supplied by Perkin-Elmer) containing europium(III) thenoyltrifluoroacetate, dissolved in a transparent matrix of polymethylmethacrylate, was used. The transmitted RTP measurements were performed using two rectangular Hellma Suprasil quartz plates (45 \times 12 \times 1 mm).

A Crison digital pH-meter with a combined glass-saturated calomel electrode, a Selecta ultrasonic bath, a Biohit Proline microtip micropipette (10 μ l in tray), a Braun Silencio 1600 hair-drier (max. power 2000 W) professional control and an infrared heat lamp (250 W) were also used. Different types of filter paper were tried as solid supports. These papers were cut in rectangular 50 \times 12 mm strips. An accessory constructed by us (Fig. 1) was used to place the sample solution on the solid support. Statistical calculations were performed using the Statgraphics software package [16].

Reagents

A stock solution (100 mg/l) of thiabendazole (Labor Dr. Ehrenstorfer) was prepared in absolute ethanol. More diluted working solutions were prepared daily by adequate dilution with reverse osmosis quality water. Stock solutions of saturated Pb(II), 1 M Tl(I), 1 M Ag(I) and 1 M I⁻ were prepared from Pb(II) acetate,

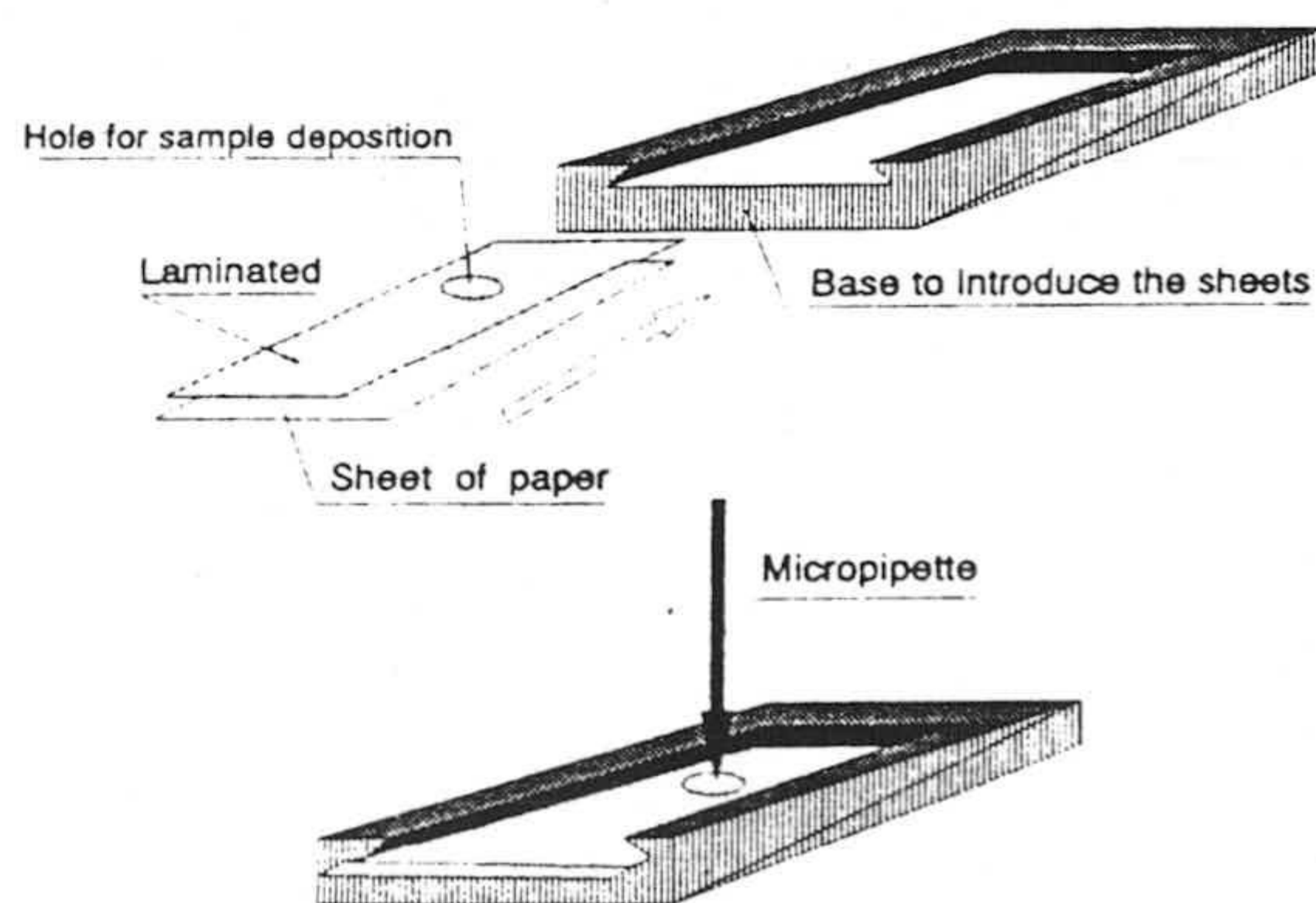


Fig. 1. Accessory for placing the aliquots of sample on the sheets of paper

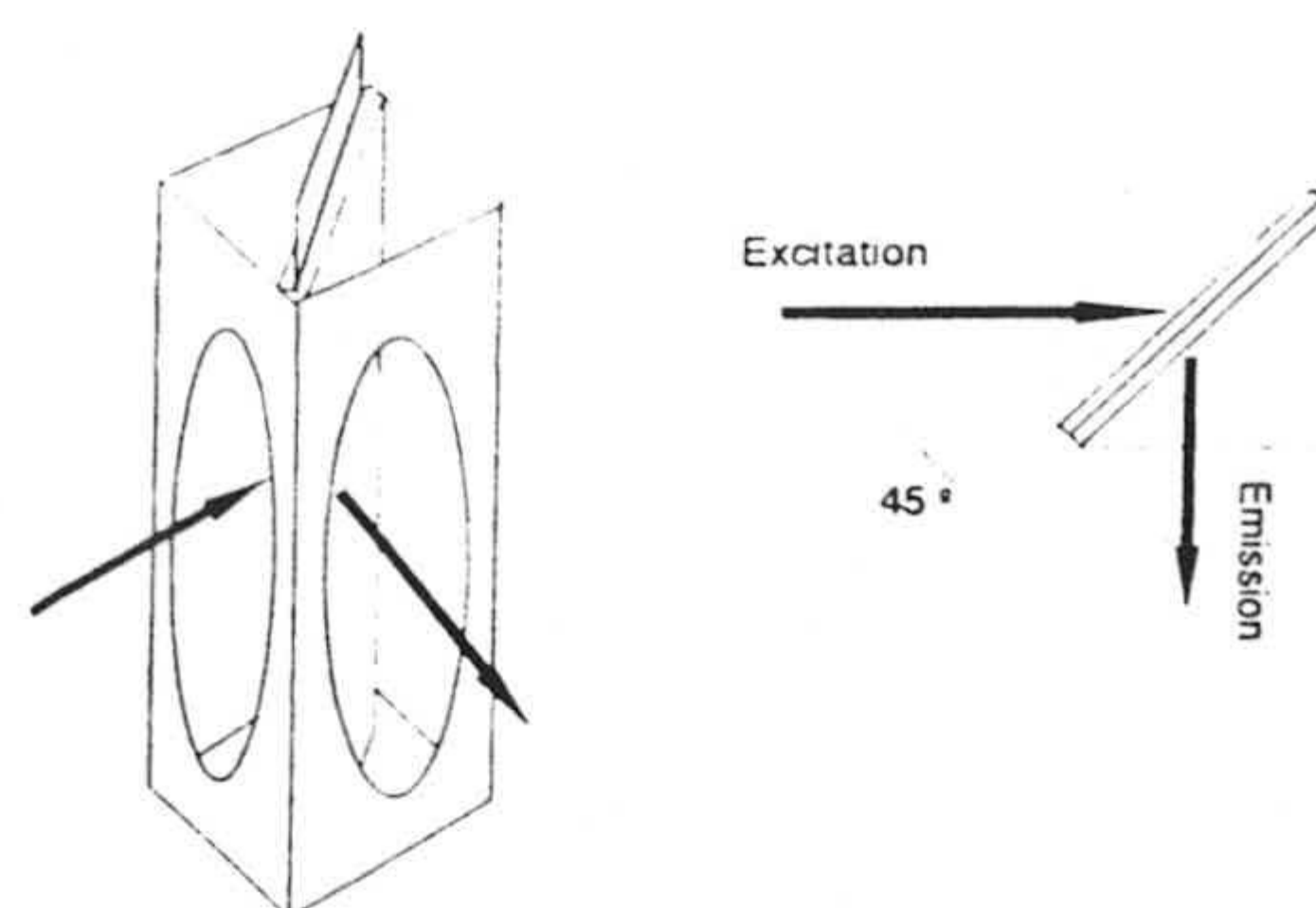


Fig. 2. Placing the sample in the instrument holder

Tl(I) nitrate, Ag(I) nitrate and KI salts (Merck). The buffer solution with the required pH (4.0) was prepared from 1 M sodium acetate salt (Merck) and 1 M acetic acid (Merck). All reagents were of analytical reagent grade unless stated otherwise. Reverse osmosis quality water was also used.

Phosphorescence Measurements

Measurements of the diffuse transmitted phosphorescence intensity, emitted from the unexcited surface of the sample (Fig. 2), were carried out at $\lambda_{em} = 472$ nm when $\lambda_{exc} = 303$ nm; the initial delay time (t_d) was set at 0.1 ms, with a gate duration (t_g) of 12 ms. The excitation and emission slits were 2.5 and 5.0 nm, respectively. The optimum angle formed between the sample plane and the excitation beam was 45°.

Procedure

1.5 μ l of saturated Pb(II) acetate solution and 2.5 μ l of sample solution containing between 0.4 and 4.5 ng of TBZ were spotted onto the delimited area of a 50 \times 12 mm strip of Whatman No. 4 filter paper soaked in pH 4.0 (acetic acid/sodium acetate) buffer solution, dried and placed in the accessory illustrated in Fig. 1. The filter paper containing the reagents was dried for 3.0 min by means of a hot air stream, after which it was placed between the two quartz plates. The assembly was then transferred to the sample compartment.

Phosphorescence Measurements

Sample preparation. Samples of tap, natural, waste and sea waters were filtered through filter paper (Millipore) with a pore size of 0.45 μ m, and collected in a glass bottle that had previously been thoroughly cleaned with hydrochloric acid. The samples were stored at 4°C until analysis, with general precautions being taken to avoid contamination [17].

Potato, green bean and lettuce samples: 40 ml of ethyl acetate was added to an aliquot of 10 g of triturated sample, containing between 0.4 and 4.5 ng of TBZ; the mixture was shaken at 700 rpm for 1 min, and filtered through a No. 4 Millipore glass filter. The solid retained in the filter was mixed with further 40 ml of ethyl acetate and the operations were repeated. Next, the solid retained in the filter was washed with further 20 ml of ethyl acetate, and the three portions of solvent (40+40+20 ml) were jointly transferred into a rotating evaporator until the solvent evaporated completely.

The solid residue was dissolved in 10 ml of absolute ethanol and evaporated until the volume was about 2.5 ml. This volume was transferred into a 25-ml calibrated flask, making the mark with absolute ethanol. If the solution has a cloudy appearance, it should be filtered through a No. 5 Millipore glass filter.

Results and Discussion

Spectral Characteristics

Figure 3 shows the excitation and emission phosphorescence spectra of both TBZ and blank, recorded

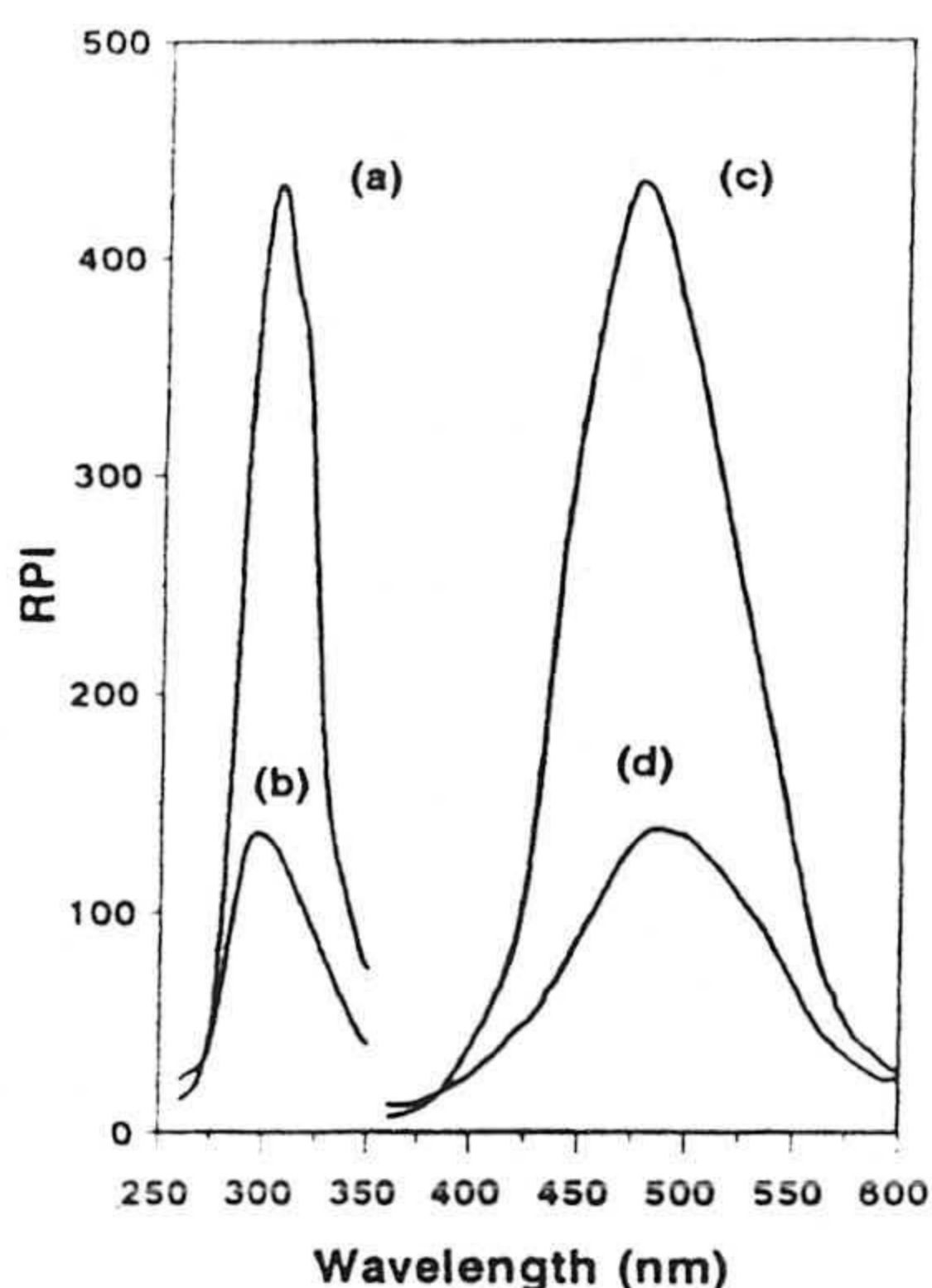


Fig. 3. Phosphorescence spectra of blank and TBZ sample (1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$): (a) excitation of TBZ; (b) excitation of the blank; (c) emission of TBZ; (d) emission of blank

between 260 and 350 nm in the cases of the excitation spectra and between 350 and 600 nm for the emission spectra ($t_d = 0.1$ ms and $t_g = 12$ ms). The concentration level used to obtain the spectra of the TBZ sample was 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$. As shown in Fig. 3, TBZ presents emission and excitation peaks located at 472 and 303 nm, respectively.

Support and Enhancer Selection

Four different types of paper were tested as the solid support: Whatman No. 1 chromatographic paper, Whatman P-81 ion-exchanger paper, Albet No. 1305 filter paper and Whatman No. 4 filter paper. The best phosphorescence signal was obtained when Whatman No. 4 filter paper was used.

With a view to minimising the signal produced by the solid support, some strips of each paper tested were placed for 24 h into a Soxhlet column with reflux of reverse osmosis water, and then dried and irradiated with ultraviolet light for 12 hours. The blanks prepared with pretreated papers presented a background signal that was three times lower than the signal from the blanks prepared with papers with no pretreatment (Table 1). In spite of this, the relative standard deviations (RSD) calculated for three sets of blanks, with ten replicates of each set, were noticeably higher (8.0%) than those obtained with the papers without pretreatment (3.5%). In addition, the net phosphorescence intensity (sample signal - blank signal) obtained for samples of (1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$) TBZ fixed in pretreated papers ($\Delta\text{PI} = 262$) was 14.2% lower than the net phosphorescence intensity obtained for

Table 1. Statistical parameters for blanks and samples (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of TBZ) measured under different experimental conditions

	B_{SN}	B_S	B_S^P	B_N	B	S_{SN}	S_S	S_S^P	S_N	S
PI ^(a)	139	137	45	98	75	443	441	307	210	130
RPI ^(b)	-	-	-	-	-	304	304	262	112	55
SD	3.2	4.8	3.6	4.2	4.5	5.9	4.8	20.7	5.1	5.2
RSD(%)	2.3	3.5	8.0	4.3	6.0	1.5	1.2	6.7	2.4	4.0

B_{SN} Blanks with quartz sheets and N_2 atmosphere.

B_S Blanks with quartz sheets and no N_2 .

B_S^P Blanks with quartz sheets and no N_2 , using pre-treated paper.

B_N Blanks with N_2 and no quartz sheets.

B Blanks with neither N_2 nor quartz sheets.

S_{SN} Samples with quartz sheets and N_2 .

S_S Samples with quartz sheets and no N_2 .

S_S^P Samples with quartz sheets and no N_2 , using pre-treated paper.

S_N Samples with N_2 and no quartz sheets.

S Samples with neither N_2 nor quartz sheets.

^(a) Phosphorescence intensity (average of ten measurements in all instances).

^(b) Relative phosphorescence intensity (Sample - Blank).

the paper with no pretreatment ($\Delta PI = 304$). Furthermore, the RSD of the sample on pretreated paper (6.7%) was higher than the RSD using paper with no pretreatment (1.2%). This could be due to the deterioration of the surface of the paper during the process of pretreatment. Indeed, the surface of the paper with no pretreatment is more even than the surface of the pretreated paper. The unevenness of the paper surface may well produce greater dispersion of the excitation beam and, in consequence, a higher RSD. We therefore used non-pretreated papers for the following experiments.

To test the influence of the nature, volume and concentration level of the different heavy atoms frequently used as enhancers of the intensity of phosphorescence, the following ions (at different concentrations and volumes) were studied: Pb(II) as acetate and nitrate salts, Tl(I) (nitrate) and KI. It was found that 1.5 μl of Pb(II) acetate saturated solution yield the best results.

Optimisation of Variables

pH dependence. Sodium hydroxide and hydrochloric acid solutions were used to adjust the pH and test its influence on the emitted phosphorescence intensity. The optimum pH for fixation of the TBZ was within the 3.5–5.5 range. Different buffer solutions were tested to adjust the pH, with acetic acid/sodium acetate (1 M pH 4.0) solutions being found to be the most appropriate.

Drying time. The influence of the drying time on the phosphorescence intensity was studied in two ways: by using (i) an infrared heat lamp (250 W), (ii) a hair-drier (500 W). Both types of heater were tested at different distances and for different periods of time. The best results were found when the hair-drier was placed at 7 cm over the sample for 3.0–4.5 minutes. A 3-min time interval was therefore used as the optimal value for subsequent measurements.

Sample volume. The influence of the sample volume spotted in the solid support was tested for a range between 0.5 and 10.0 μl of solution. The results show a linear increase on the phosphorescence intensity when the volume of sample increases from 0.5 μl to 2.5 μl . The phosphorescence intensity remains constant between 2.5 and 4.0 μl of sample volume and decreases at higher values. 2.5 μl of sample volume was selected as the working volume.

Instrumental parameters. In order to check the influence of the instrumental parameters on the phosphorescence intensity emitted from the sample, the following parameters were studied: scan speed, excitation and emission slit sizes and delay and gate times. It was observed that the phosphorescence intensity is not influenced by the scan speed when the value of this parameter ranged between 60 and 480 nm/min. 240 nm/min was selected for subsequent experiments. To check the influence of the excitation and emission slit size, values of 2.5, 5.0 and 10.0 nm were tested, with 2.5 nm and 5.0 nm being selected as the optimal values for excitation and emission, respectively. Finally, the delay time (between 0.1 and 0.5 ms) and gate time (between 4.0 and 14.0 ms) were tested by measuring the phosphorescence intensity emitted in all cases. It was found that 0.1 ms and 12.0 ms were the optimal values for the delay time and gate time, respectively.

Influence of Atmospheric Oxygen

One of the main problems posed by analytical applications of phosphorescent methods is the quenching effect produced from atmospheric oxygen and moisture, whereby the phosphorescence intensity of the initially fresh samples decreases sharply. As described in the literature, a dried nitrogen atmosphere is required in the spectrometer holder in order to perform the phosphorescence measurements. To minimise this effect, instead we sandwiched the sample between two quartz sheets (solid support with

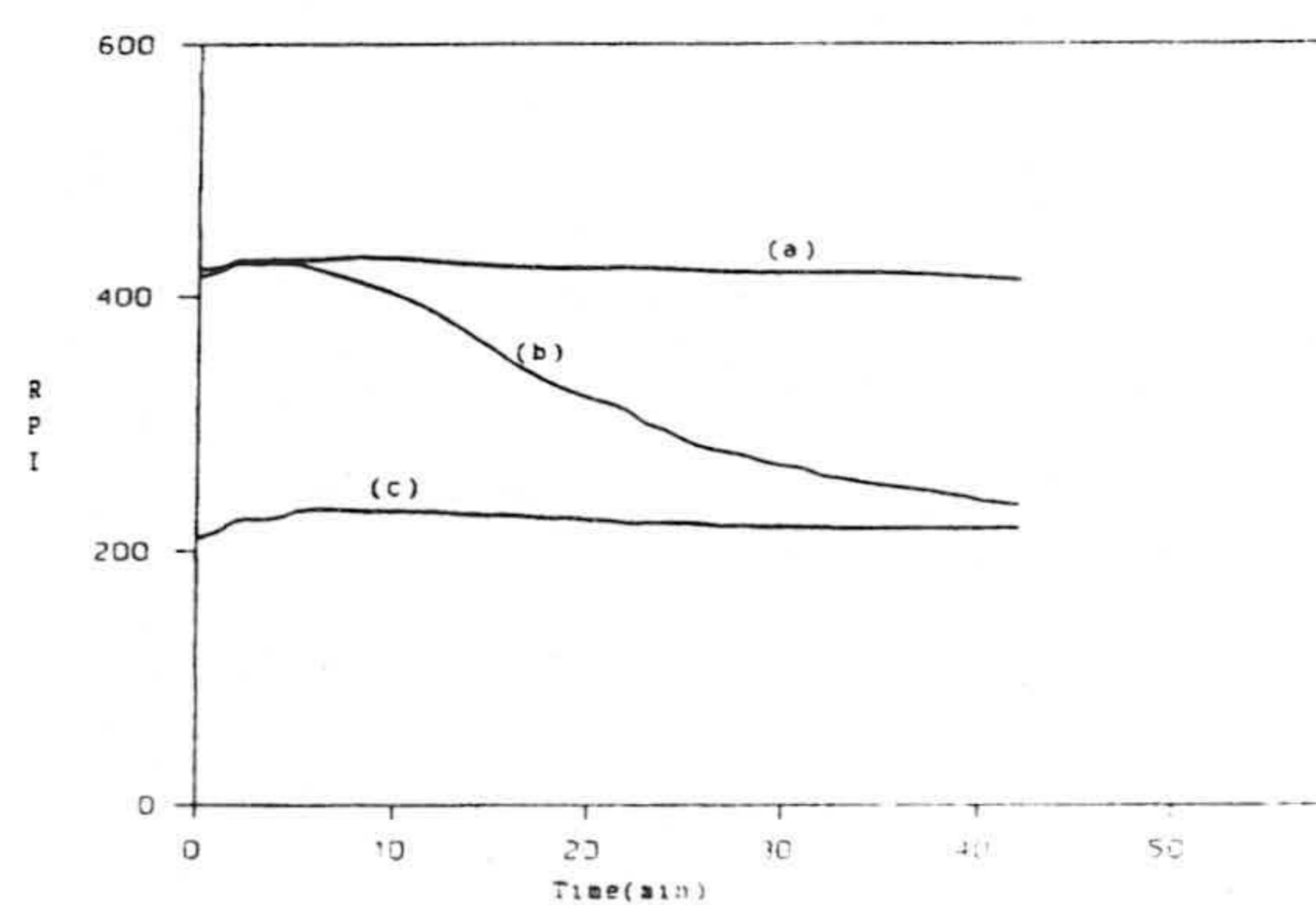


Fig. 4. Influence of time on the phosphorescence intensity of TBZ (1.0 $\mu\text{g/ml}$) under different experimental conditions: (a) with quartz sheets and N_2 atmosphere; (b) with quartz sheets and no N_2 ; and (c) with N_2 atmosphere and no quartz sheets

the analyte). The quenching effect was determined by measuring the phosphorescence intensity with and without the quartz sheets and with and without a nitrogen atmosphere. The results obtained (Table 1 and Fig. 4) show that with quartz plates and without N₂ the phosphorescence intensity remains constant for 6 min. It then decreases slowly down to a value 5.0% less than its initial value at 9 min, and finally decreases to 38.0%, 40 min after the preparation of the sample.

As the use of the nitrogen atmosphere does not noticeably improve the phosphorescence intensity values when measurements are made before 6 min has elapsed, the next measurements of phosphorescence were carried out, using the quartz plates and without a nitrogen atmosphere, three minutes after the preparation of the sample, to maintain the experimental conditions constant in all instances.

Analytical Parameters

The calibration graphs were obtained by the use of 18 solutions of TBZ at different concentration levels (from 160 to 1200 ng/ml). Three replicates were prepared from each of these solutions according to the procedure described above in the section *Basic procedure*, and the *lack-of-fit* test [16] was applied to test linearity, as suggested by the Analytical Methods Committee [18]. The results obtained show the existence of a linear relationship between the phosphorescence intensity and the TBZ concentration ($RPI = 0.2839C + 24.3$), where RPI is the relative phosphorescence intensity (sample – blank) and C is the TBZ concentration measured in ng/ml.

To obtain the standard deviation of the blank, ten solutions containing all the reagents except for the TBZ were prepared and measured in the same way as described for the samples. These blanks were measured with and without a nitrogen atmosphere and with and without quartz plates within the atmospheres. A blank sample was prepared for each measurement. The standard deviations obtained are summarised in Table 1, which also includes the relative standard deviation values and the phosphorescence values for the blanks and samples. The IUPAC detection limits [19] and the quantification limit [20] were calculated from the standard deviation values of the ten samples measured without nitrogen and using the two quartz plates. The values obtained were 47.7 and 158.9 ng/ml for the detection and

Table 2. Analytical parameters

Intercept	24.3
Slope	0.2893
Correlation coefficient	0.9988
Lack-of-fit test (P-value)	0.78
Linear dynamic range (ng/ml)	160.0–1200.0
Detection limit (ng/ml)	47.7
Quantification limit (ng/ml)	158.9
Precision (RSD) %	1.2
Linearity [100-RSD (slope)]%	99.99

quantification limits, respectively. These results are summarised in Table 2.

The precision of the method was determined as the relative standard deviation of the phosphorescence intensities of ten samples. These samples were prepared from a solution of TBZ containing 1.0 µg/ml of analyte, and the measurements of the phosphorescence intensity were performed with and without a nitrogen atmosphere. The results obtained show that there is no notable difference between the two cases (Table 1).

Effect of Foreign Ions or Species

A systematic study was carried out of the effect of different pesticides, organic species and foreign ions that potentially may interfere in the determination of TBZ at concentration levels of 1.0 µg/ml. The ions were tested with a concentration level of 10 µg/ml, while organic species and pesticides were tested at different concentrations according to their respective solubility. If interference was detected, the ratio was progressively reduced until the interference ceased, taking as the tolerance level the greater amount of foreign species producing an error not exceeding ±5.0% in the determination of the TBZ. The results obtained are summarised in Table 3. The most serious interference was produced by the presence of the pesticides carbaryl and warfarin at concentration levels equal to or greater than 1.5 and 2.0 µg/ml, respectively, because these chemicals present phosphorescence in similar conditions to TBZ.

Other pesticides widely used in farming, such as three triazine derivatives (atrazine, terbutrin, hexazinone) and paraquat, dicuat or endosulfan do not present luminescent properties and show no chemical interference, when present in the sample.

Table 3. Effect of foreign species on the determination of 1.0 µg/ml of TBZ

Ion or species	Tolerance level (µg/ml)
Li(I); Na(I); K(I); NH ₄ (I); SO ₄ ²⁻ ; Cl ⁻	
Ca(II); Mg(II)	no interference
NO ₃ ⁻ ; Al(III); Be(II)	< 5.0
Fe(III); PO ₄ ³⁻	< 2.0
Humic acid; benomyl dichlone; captan; lindane; 1-naphthol	>10.0 or at saturation levels in water
Warfarin	< 2.0
Carbaryl	< 1.5

Applications of the Method

Applying the method to the determination of TBZ in potatoes, lettuce, green beans and waters, the results obtained show in all cases that the pesticide is not present or the amounts are lower than the limit detectable by the method. A recovery study was therefore carried out to check the accuracy of the proposed method. In this study, the amount of TBZ in the samples was also determined by using of HPLC [36] as reference method.

In the case of water analysis, different types of waters, tap water from the city of Granada, several proprietary brands of mineral water, sea water from Motril (Granada) and natural water from the river Genil (Granada), were analysed after appropriate additions of TBZ. In all instances, when the proposed method was applied the recovery rates ranged between 95.9 and 103.1% (Table 4). These values

Table 4. Study of TBZ recovery in samples of waters

Water	Added	Found (ng/ml) ^a		
		this method	RSD(%)	HPLC
Tap water	1000.0	967.6	2.3	960.0
(Granada city)	500.0	486.0	2.4	490.0
Mineral water	1000.0	965.0	2.8	970.3
(Lanjarón)	500.0	480.2	2.9	470.0
Mineral water	1000.0	1028.1	1.9	999.8
(Fontdor)	500.0	499.5	2.6	502.1
Mineral water	1000.0	983.5	2.6	981.3
(Fontbella)	500.0	481.6	2.7	476.5
Sea water	1000.0	966.1	3.2	970.2
(Motril)	500.0	480.2	4.0	485.3
River water	1000.0	991.3	2.5	990.2
(river Genil)	500.0	481.7	2.0	479.8

^a These data are the average of three independent determinations.

Table 5. Recovery study of TBZ in foods

Food	Added (ng/ml)	Found (ng/ml) ^a		
		this method	RSD(%)	HPLC
Green beans	1000	996	3.2	1000
	500	491	4.4	490
	250	247	3.1	240
Potatoes	1000	981	3.2	978
	500	489	3.1	487
	250	240	3.6	238
Lettuce	1000	972	2.1	979
	500	490	1.2	486
	250	242	2.7	249

^a Expressed as ng/mg of TBZ.

^b This data are the average of three independent determinations.

are the average of three different determinations and the null hypothesis test ($\alpha = 0.05$) was applied to validate the results.

For potatoes, green beans and lettuce, a quantity of about 500 g was triturated and then the appropriate volume of TBZ solution was added to a weighed amount. The mixture was shaken mechanically for 30 min and then stored at 4°C before analysis. Table 5 shows the results obtained as the average of three independent measurements in each case. The null hypothesis test was also applied ($\alpha = 0.05$) to validate the experimental results.

Table 6. Methods for determination of TBZ in different matrices

Sample	Technique-detection	DL ^a	Reference
Waters	fluorescence	26.2	21
Pears	solid phase fluorimetry	0.5	22
Banana	LC-fluorescence	50.0	23
Foods	LC-fluorescence	250.0	24
Crops	LC-fluorescence	-	25
Fruits	HPLC-fluorescence	100.0	26
Fruits	HPLC reverse phase	1.0	27
Vegetables	HPLC-fluorescence	-	28
Fruits	LC-fluorescence	1.0	29
Fruits	HPLC-fluorescence	10.0	30
Waters	Solid phase fluorimetry	0.1	31
Vegetables	fluorimetry	24.0	32
Fruits	ion-par-HPLC	13.0	33
Fruits	TLC-fluorescence	-	34
Waters	HPLC-reverse phase	4.0	35
Waters	HPLC	1.0	36
Fruits	LC	50.0	37
Sweet/potatoes	LC	50.0	38
Water/vegetable	phosphorimetry	47.7	this method

^a Detection limit in ng/ml.

Conclusions

The study shows that TBZ can be analysed by using transmitted room-temperature phosphorimetry as the analytical property for the determination of the analyte without using a dry N₂ atmosphere. As shown in Table 6, the detection limit of this method is comparable with that of other methods described in the analytical literature, but the proposed method offers the advantages of a simpler experimental procedure and a lower cost for each analysed sample when measuring TBZ in waters or vegetables. The validity of dispensing with a dry atmosphere for the phosphorescence measurements remains to be confirmed by carrying out further studies with different analytes.

Acknowledgments. This study was founded by the General Sub-directorate for Training and Knowledge-Sharing of the Spanish Ministry of Education and Culture (Project No PB96-1404).

References

- [1] T. Vo-Dinh, *Room Temperature Phosphorimetry for Chemical Analysis*, Wiley Interscience, New York, 1984.
- [2] R. J. Hurtubise, *Phosphorimetry: Theory, Instrumentations and Applications*, VCH Publishers, Inc., New York, 1990.
- [3] M. J. Roth, *J. Chromatogr.* **1967**, *30*, 276.
- [4] J. J. Vannelli, E. M. Schulman, *Anal. Chem.* **1984**, *56*, 1030.
- [5] S. Y. Su, E. Asafu-Adjaye, S. Ocak, *Analyst* **1984**, *109*, 1019.
- [6] R. Q. Aucélio, A. D. Campiglia, *Anal. Chim. Acta* **1995**, *309*, 345.
- [7] T. Vo-Dinh, E. Lue Yen, J. D. Winefordner, *Anal. Chem.* **1976**, *48*, 1186.
- [8] M. C. García Álvarez-Coque, G. Ramis Ramos, A. M. O'Reilly, J. D. Winefordner, *Anal. Chim. Acta* **1988**, *204*, 247.
- [9] S. Scypinski, L. J. Cline Love, *Anal. Chem.* **1984**, *56*, 322.
- [10] S. Scypinski, L. J. Cline Love, *Anal. Chem.* **1984**, *56*, 331.
- [11] J. Weijun, L. Changsong, *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 863.
- [12] W. Yansheng, J. Weijun, Z. Rohua, L. Changsong, Z. Sushe, *Talanta* **1994**, *41*, 1617.
- [13] S. Panadero, A. Gómez-Hens, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 919.
- [14] M. C. Simeone Gioia, A. D. Campiglia, *Anal. Chem. Acta* **1994**, *287*, 89.
- [15] M. E. Díaz-García, A. Sanz-Medel, *Anal. Chem.* **1986**, *58*, 1436.
- [16] Statgraphics v.6.0 Manugistics Inc. and Statistical Graphics Corporation, USA, 1992.
- [17] *Standard Methods for the Examination of Water and Waste Waters*, 15 Edn., American Public Health Association, Washington DC, 1981.
- [18] Analytical Methods Committee, *Analyst* **1994**, *119*, 2363.
- [19] Analytical Methods Committee, *Analyst* **1988**, *113*, 1469.
- [20] Guidelines for Data Acquisition and Data Quality Evaluation, *Anal. Chem.* **1980**, *52*, 2242.
- [21] J. A. Koropchak, E. D. Zlotorzynska, *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 328.
- [22] L. F. Capitán-Vallvey, R. Avidad, J. L. Vilchez, *J. Ass. Off. Anal. Chem. Internat.* **1994**, *77*, 1651.
- [23] R. V. Arenas, N. A. Johnson, *J. Ass. Off. Anal. Chem. Internat.* **1994**, *77*, 710.
- [24] D. M. Gilvydis, M. S. Walters, *J. Ass. Off. Anal. Chem. Internat.* **1990**, *73*, 753.
- [25] M. Hiemstra, J. A. Joosten, A. Dekok, *J. Ass. Off. Anal. Chem. Internat.* **1995**, *78*, 1267.
- [26] P. Mock, E. Scherbaum, *Deutsche Lebensmittel Rundschau* **1995**, *191*, 385.
- [27] A. Sannino, *Foods Chem.* **1995**, *52*, 57.
- [28] S. N. Aharonson, S. J. Lechtay, M. A. Ibrahim, *J. Agric. Foods Chem.* **1994**, *42*, 2817.
- [29] R. J. Bushway, L. Li, L. P. Paradis, L. B. Perkins, *J. Ass. Off. Anal. Chem. Internat.* **1995**, *78*, 815.
- [30] J. G. Farrow, R. A. Hoodless, M. Sargent, J. A. Sidwell, *Analyst* **1977**, *102*, 752.
- [31] F. Capitán, E. J. Alonso, R. Avidad, L. F. Capitán-Vallvey, J. L. Vilchez, *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 1336.
- [32] F. García Sánchez, C. Cruces Blanco, *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 232.
- [33] M. Nakazato, K. Saito, Y. Kikuchi, A. Ibe, K. Fujinuma, T. Hishina, *Eisei Kagaku* **1988**, *34*, 401.
- [34] H. Ottender, U. Hezel, *J. Chromatogr.* **1975**, *109*, 181.
- [35] R. C. Wegman, H. H. Vanden Brock, *Meded. Fac. Landbouwwet Rijksuniv. Gent.* **1982**, *47*, 361.
- [36] V. Dilna, H. Rex, S. Jeff, S. A. Whitlock, *J. Chromatogr.* **1984**, *283*, 383.
- [37] R. V. Arenas, H. Rahman, N. A. Johnson, *J. Ass. Off. Anal. Chem. Internat.* **1996**, *79*, 579.
- [38] R. V. Arenas, H. Rahman, N. A. Johnson, *J. Ass. Off. Anal. Chem. Internat.* **1995**, *78*, 1455.

Received February 18, 1998. Revision July 15, 1998.

APÉNDICE N° 4

Titulo: Determinación of Morestan residues in Water and Foodstuffs by Transmitted Room - Temperature Solid-Phase spectroPhosphorimetry.

Autores: L. F. Capitán-Vallvey, M. K. Deheidel, and R Avidad.

Revista: Anal. Lett 31(15), 2767-2789 (1998).

- IUPAC Guidelines for data acquisition and data quality evaluation (1980) *Anal Chem* 52:2242–2249
- Hollifield HC, Winefordner JD (1967) Fluorescence and phosphorescence characteristics of anticoagulants. *Talanta* 14:103–107
- Hunter KJ (1985) High-performance liquid chromatographic strategies for the determination and confirmation of anticoagulants rodenticide residues in animal tissues. *J Chromatogr* 321:255–272
- Kitade T, Kitamura K, Hayakawa J, Nakamoto E, Kishimoto N (1995) Poly(vinyl alcohol) as solid substrate material for room-temperature phosphorimetry. *Anal Chem* 67:3806–3808
- Márquez JC, Hernández M, García-Sánchez F (1990) Enhanced spectrofluorimetric determination of the pesticide warfarin by means of the inclusion complex with β -cyclodextrin. *Analyst* 115:1003–1005
- Steyn JM, van der Merwe HM, de Koch MJ (1986) Reversed-phase high-performance liquid chromatographic method for the determination of warfarin from biological fluid in the low nanogram range. *J Chromatogr* 378:254–260
- Statgraphics (1992) Statgraphics, version 6.0. Manugistics Inc. and Statistical Graphics Corporation, Rockville, MD
- Syang Yang S, Asatu-Adjaye E, Ocak S (1984) Room-temperature phosphorimetry of pesticides using a luminescence sampling system. *Analyst* 109:1019–1023
- Vanelli JJ, Schulman EM (1984) Solid surface room-temperature phosphorescence of pesticides. *Anal Chem* 56:1030–1033
- Vilchez Quero JL, Jamal Rohand, Navalón Montón A, Avidad Castañeda R, Capitán-Vallvey LF (1996) Determination of warfarin at trace-levels in water by solid-phase spectrofluorimetry. *Fresenius J Anal Chem* 354:470–473
- Weijun J, Changsong L (1993) Luminescence rule of polycyclic aromatic hydrocarbons in micelle-stabilized room-temperature phosphorescence. *Anal Chem* 65:863–865
- Welling PG, Lee KP, Khanna V, Wagner JC (1970) Comparison of plasma concentration of warfarin measured by both simple extraction and TLC methods. *J Pharm Sci* 59:1621–1625
- Yansheg W, Weijun J, Rohua Z, Changsong L, Sushe Z (1994) Determination of the pesticide carbaryl by chemical deoxygenation micellar-stabilized room-temperature phosphorescence. *Talanta* 41:1617–1621

Table 3. Analytical figures of merit

Slope	40.79
Intercept	4.56
Linear dynamic range (mg · L ⁻¹)	0.3–4.0
Relative standard deviation (%) ^a	2.3
p value (%) (lack-of-fit test)	25.82
Detection limit (mg · L ⁻¹)	0.08
Quantification limit (mg · L ⁻¹)	0.28

^a Obtained from 10 independent samples containing 2.0 mg · L⁻¹ of warfarin

Table 4. Influence of foreign species on the determination of 2.0 mg · L⁻¹ of warfarin in water samples

Foreign Ions	Tolerance Level (mg · L ⁻¹)	Foreign Species	Tolerance Level (mg · L ⁻¹)
		Dichlone	NI
		Benomil	NI
		Lindane	NI
		Captan	NI
		Carbaryl	1.5
SO ₄ ²⁻ ; CO ₃ ²⁻ ; PO ₄ ³⁻ ; NO ₃ ⁻ ; Cl ⁻ ; Al (III); Fe (III); Cu (II); Mg (II); Ca (II)	>25.0	Thiabendazole Humic acids	0.5 NI

NI: These species do not produce interferences at concentration levels below their solubility in water

Table 5. Recovery study of warfarin in water

Sample	Taken*	Found ^{a,b}	RM ^{a,c}	p value (%)
Tap water (Granada city)	1.0	1.09	1.08	76.3
	2.0	2.02	2.05	42.8
	4.0	4.06	4.02	26.1
Mineral water (Lanjarón)	1.0	1.00	1.01	82.2
	2.0	2.06	2.02	94.2
	4.0	4.04	4.03	95.5
Mineral water (Fontdor)	1.0	0.99	1.00	54.3
	2.0	1.93	2.00	62.1
	4.0	3.96	4.01	41.3
Mineral water (Fontvella)	1.0	1.02	0.99	23.8
	2.0	1.98	2.01	21.3
	4.0	4.03	4.01	20.8
Surface water (Genil River, Granada)	1.0	1.01	1.01	85.5
	2.0	2.02	2.01	82.3
	4.0	3.91	3.99	26.9
Sea water (Mediterranean)	1.0	0.93	1.01	26.8
	2.0	2.08	2.04	21.2
	4.0	4.04	4.00	20.5

^a Mean values of three determinations expressed in mg · L⁻¹

^b Found by our method

^c Found by reference method

Recovery Study in Water

Six different kinds of water (three mineral waters of diverse provenance, tap water of Granada city, sea water from the Mediterranean Sea, and surface water from the Genil River in Granada), were selected as representative samples of water and were analyzed after additions of 0.5, 2.0, and 4.0 mg · L⁻¹ of warfarin. Table 5 shows the results obtained by our method and by the reference method (Márquez *et al.* 1990), together with the p values of the *t* test from the comparison of both results.

Table 6. Recovery study of warfarin in human plasma

Sample	Taken*	Found ^{a,b}	RM ^{a,c}	p Value (%)
No. 1	1.0	1.00	1.01	82.1
	2.0	1.94	2.01	40.2
	4.0	3.98	4.00	38.7
No. 2	1.0	0.96	0.99	60.5
	2.0	2.06	2.07	62.8
	4.0	4.01	3.98	48.3
No. 3	1.0	0.95	0.94	30.4
	2.0	1.89	1.90	32.8
	4.0	4.10	3.98	40.1

^a Mean values of three independent determinations expressed in mg · L⁻¹

^b Found by our method

^c Found by reference method

Recovery Study in Human Plasma

Three different samples of human plasma were spiked with 1.0, 2.0, and 4.0 mg · L⁻¹ of warfarin. To eliminate the interferences produced by the albumin present in the serum, 3 ml of Na₂SO₄ saturated solution, for each 1 ml of serum, were added. The mixture was shaken for 1 min, the precipitate formed was separated by filtration, and the samples were analyzed by using standard addition methodology. Results are summarized in Table 6, which also included the results obtained by the reference method (García Sánchez and Cruces Blanco 1989) and the p values of the *t* test of comparison for a signification level of 0.05.

References

- Analytical Methods Committee (1994) Is my calibration linear? *Analyst* 119:2363–2366
- Analytical Methods Committee (1988) Uses (proper and improper) of correlation coefficients. *Analyst* 113:1469–1471
- APHA (1981) Standard methods for the examination of waters and waste waters, 15th ed. American Public Health Association, Washington, DC
- Capitán-Vallvey LF, Ojeda MF, del Olmo M, Navalón A, Avidad R, Vo-Dihn T (1998) Use of transmitted room-temperature phosphorescence to improve nalidixic acid determination. *App Spectrosc* 52:101–105
- Cline Love LJ, Skrilec M, Habarta JG (1980) Analysis by micelle-stabilized room-temperature phosphorescence in solution. *Anal Chem* 52:754–759
- Corn M, Berberich R (1967) Rapid fluorometric assay for plasma warfarin. *Clin Chem* 13:126–31
- Díaz-García ME, Sanz-Medel A (1986) Facile chemical deoxygenation of micellar solutions for room-temperature phosphorescence. *Anal Chem* 58:1436–1440
- Femia RA, Cline Love LJ (1984) Micelle-stabilized room-temperature phosphorescence in solution. *Anal Chem* 56:327–331
- Fishwich FB, Taylor A (1967) The determination of warfarin in animal relicta. *Analyst* 92:192–195
- García Álvarez-Coque MC, Ramis Ramos G, O'Reilly AM, Winefordner JD (1988) Paper-substrate room-temperature phosphorescence of phenothiazine derivatives enhanced by thallium (I) nitrate and surface active agents. *Anal Chim Acta* 204:247–258
- García Sánchez F, Cruces Blanco C (1989) Synchronous derivative room-temperature phosphorescence determination of warfarin in blood serum. *Anal Chim Acta* 222:177–188

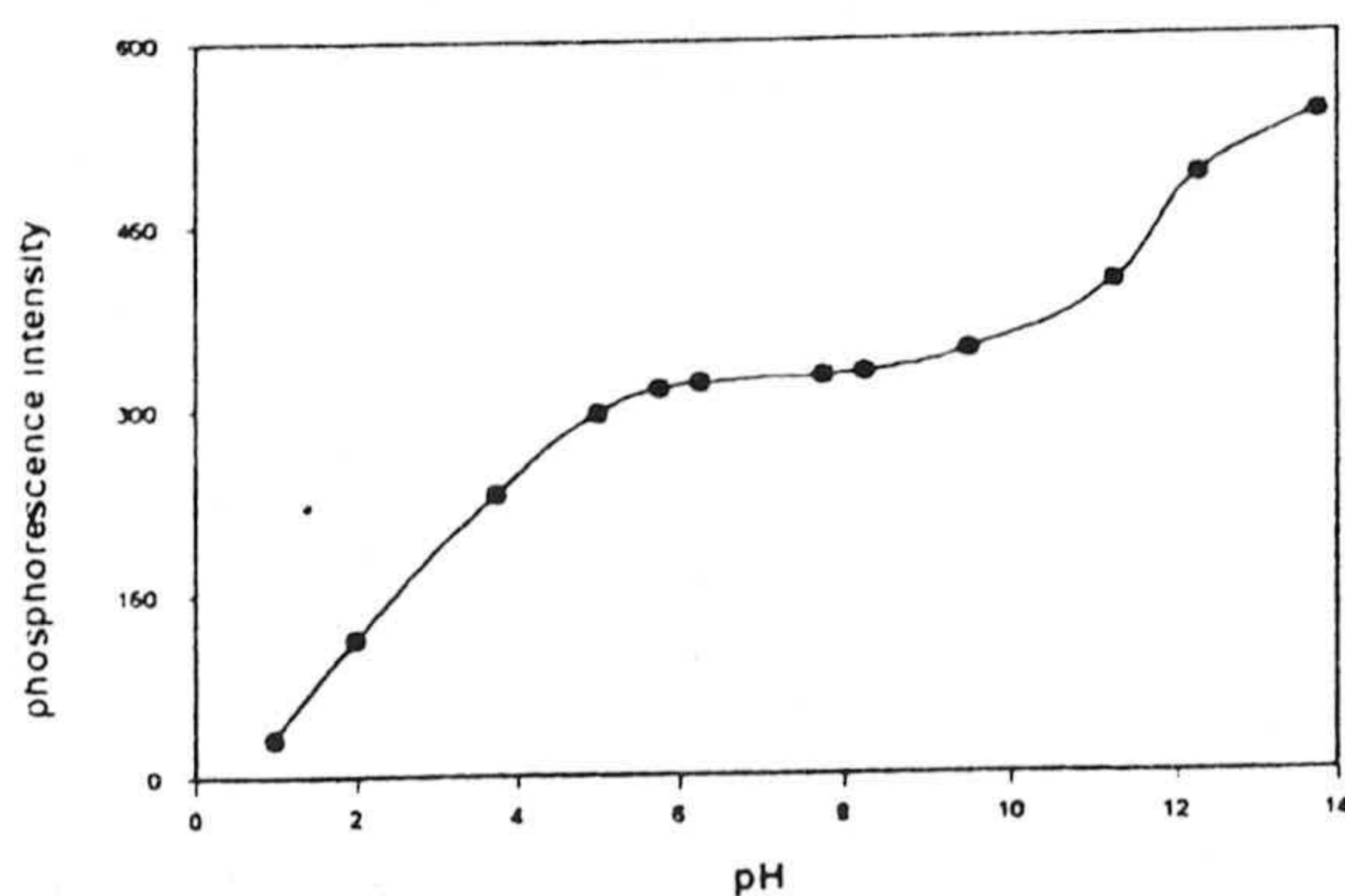


Fig. 3. pH influence on the phosphorescence intensity of warfarin ($2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)

Table 1. Influence of addition order of the reagents on the phosphorescence intensity of warfarin

Reagents	RPI ^a	RPI (%) ^b
NaOH + iodide + warfarin	92	100
Iodide + NaOH + warfarin	32	35
Warfarin + NaOH + iodide	27	29
NaOH + warfarin + iodide	19	21
Warfarin + iodide + NaOH	11	12
Iodide + warfarin + NaOH	4	4

^a Relative phosphorescence intensity (sample—blank)

^b These percentages of RPI were calculated with respect to the maximum value of RPI (92), taken as 100%

Table 2. Initial phosphorescence intensity of warfarin sample ($2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) and blank with and without quartz sheets and with and without N_2

Experimental Conditions	Phosphorescence Intensity ^a	
	Sample	Blank
With quartz sheets and N_2	338	38
With quartz sheets and without N_2	336	38
Without quartz sheets and with N_2	56	19
Without quartz sheets and without N_2	46	16

^a These measurements were performed 2 min after preparation of the samples

Analytical Parameters

To obtain analytical figures of merit, 10 standards of warfarin (between 0.3 and $4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), with three replicates for each standard, were prepared according to the procedure described in the section on General Procedure. As suggested by the Analytical Methods Committee (1994), the lack-of-fit test was applied to probe the linearity of the experimental data and to establish the upper limit of the linear dynamic range of the figure of merit.

The precision of the method, expressed as relative standard deviation (RSD) of 10 samples (in which concentration of warfarin was $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) was 2.3% and the RSD for 10 blanks 3.1%. The standard deviation of these 10 blanks was

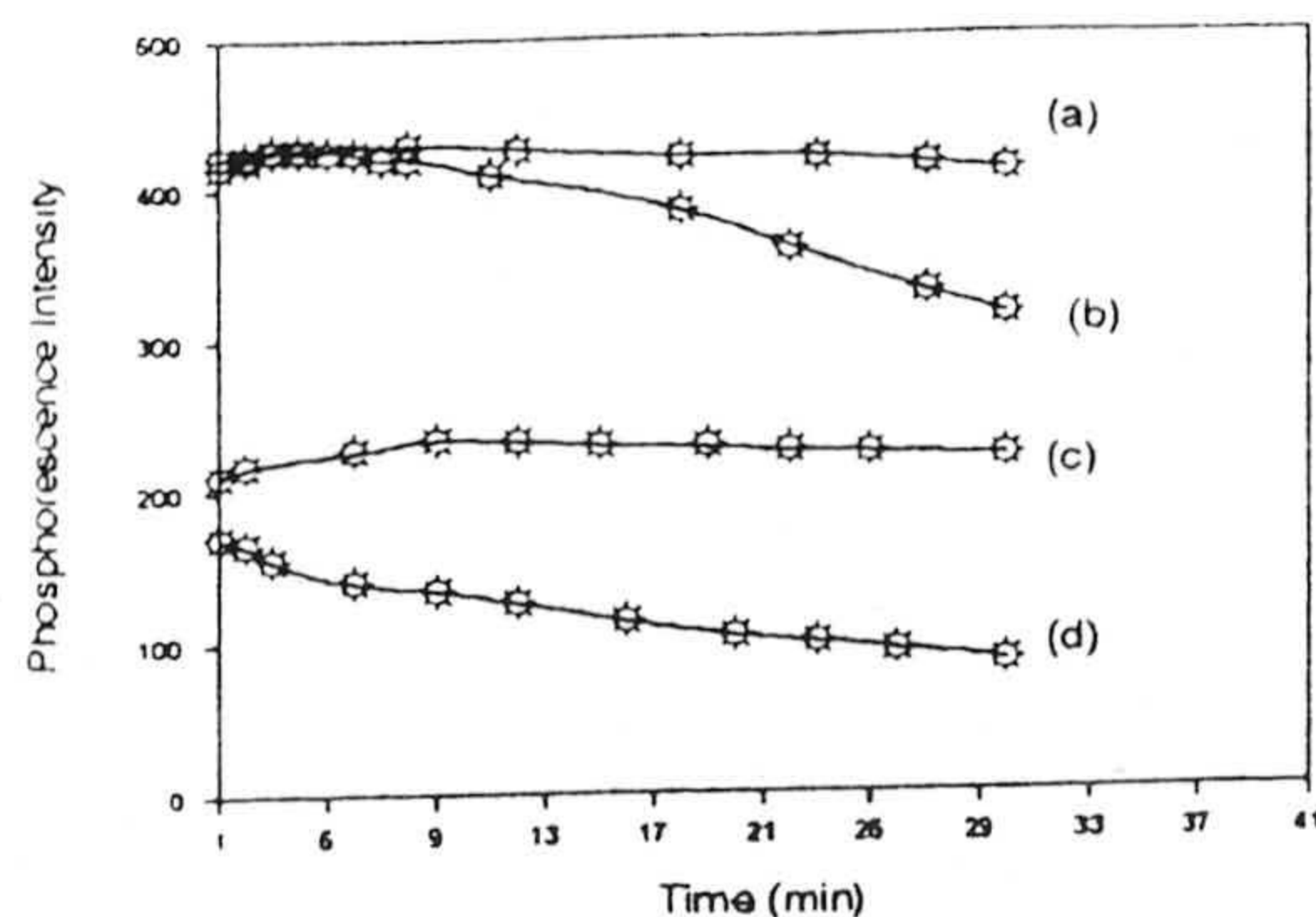


Fig. 4. Influence of the time on the phosphorescence intensity of warfarin ($2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) at different experimental conditions: (a) with quartz sheets and N_2 atmosphere; (b) with quartz sheets and without N_2

used to calculate the IUPAC detection limit (Analytical Methods Committee 1988) (DL) and quantification limit (Guidelines 1980), (QL), DL being $0.08 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and QL $0.28 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively. The results of the statistical calculations are summarized in Table 3.

Effect of Foreign Ions or Species

The effect of different ions, organic species, and other pesticides, occasionally present in natural waters, on the determination of $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ of warfarin was systematically studied. The ions were tested at $25.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ concentration levels, and the organic species and other pesticides were tested at different concentrations depending on their respective solubility in water. If interference occurred at a certain value of concentration, the ratio was progressively reduced until the interference ceased. As a tolerance level we took the larger amount of foreign species producing an error $< \pm 5.0\%$ in the determination of warfarin.

As can be seen in Table 4, the most serious interferences were produced by the presence of the pesticides carbaryl and thiabendazole. Concentration levels equal to or higher than $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ of carbaryl or $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ of thiabendazole produce an error higher than 5% in the determination of $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ of warfarin. The interferences produced by these pesticides are due to the phosphorescence shown by both chemicals that is similar to the phosphorescence of the warfarin.

Applications of the Method

The method was applied to the determination of warfarin in human plasma and different kinds of water, using calibration graphs in the case of water and the standard addition method for human plasma. The warfarin concentration in all samples was found to be lower than the detection limit of the method. Therefore, the accuracy of the method had to be established by means of a recovery study in water and human plasma samples spiked with different amounts of warfarin.

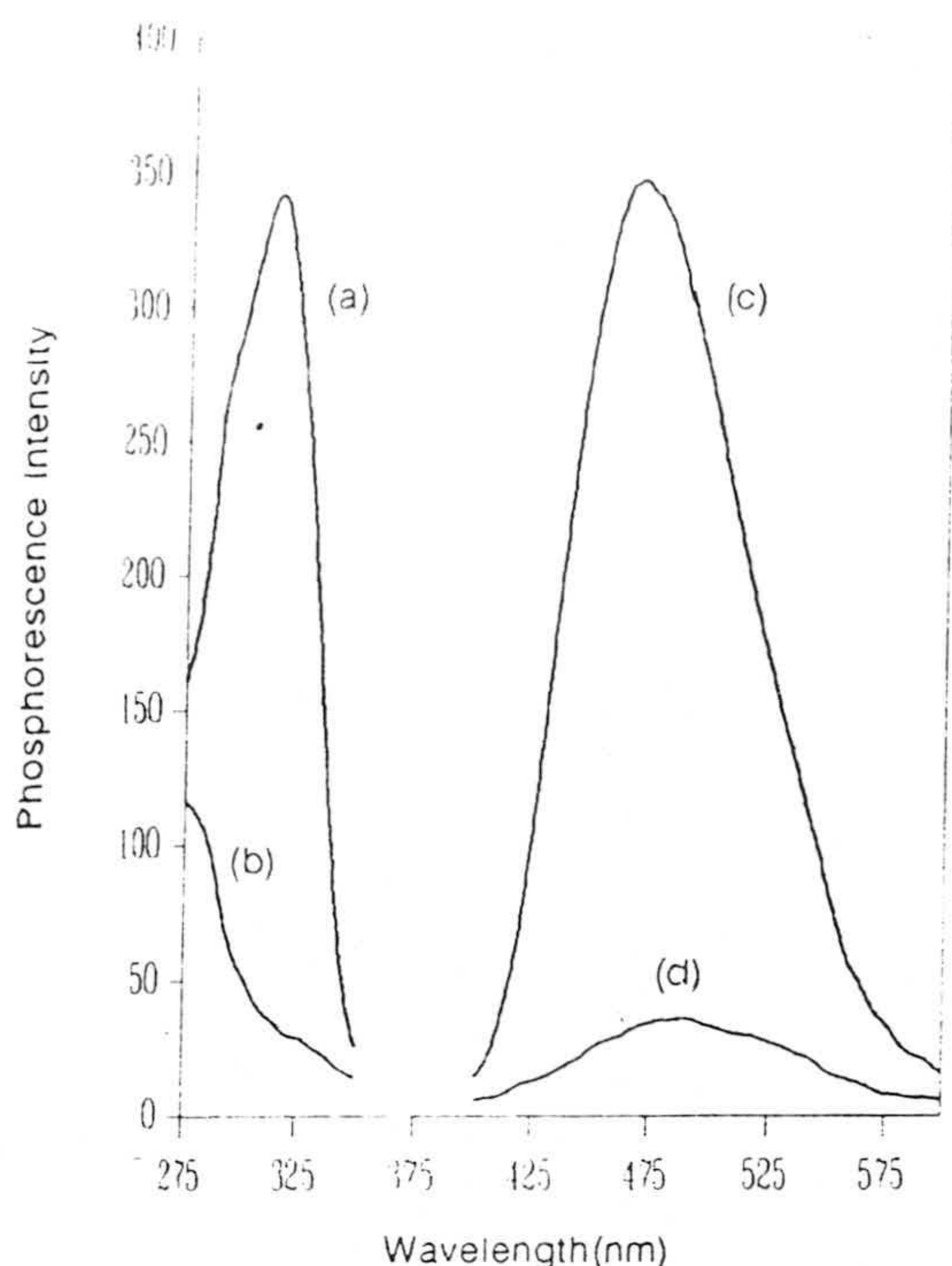


Fig. 2. Phosphorescence spectra of blank and warfarin sample ($2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$): (a) excitation of warfarin; (b) excitation of the blank; (c) emission of warfarin; (d) emission of blank

scan speed, excitation and emission slit sizes, volume and concentration level of enhancer, pH, sample volume, drying time, and order of addition, were checked.

Instrumental Parameters: First, t_d was tested between 0.1 and 0.5 ms with a constant value of 12 ms for t_g . Next, t_g was tested between 4.0 and 15.0 ms for $t_d = 0.1$ ms. Maximum phosphorescence intensity was obtained when $t_g = 12$ ms and $t_d = 0.1$ ms. Second, the influence of the slit size (from 2.5 to 10.0 nm) on the phosphorescence intensity was studied. 2.5 nm for excitation and 10.0 nm for emission were selected as optima. Finally, it was found that the phosphorescence intensity was not influenced by the scan speed.

Volume and Concentration of KI: Different volumes of enhancer, between 1.0 and 14.0 μl of 2 M KI solution, were checked. It was found that the phosphorescence intensity increases when the volume increases from 1.0 to 10.0 μl , whereas for volumes higher than 10.0 μl the phosphorescence intensity remains constant, probably due to the fact that the mark produced by the solution reaches the sides of the strips of the paper. Taking 10 μl as a working volume, the influence of the concentration levels of KI was checked using different solutions whose concentrations ranged between 0.1 and 3.0 M. It was found that 2 M solution produces the largest difference between the sample signal and blank signal. Next, different volumes (between 1.0 and 14.0 μl) of 2.0 M KI were tested to

prove that 10.0 μl was effectively the optimum volume of sample. It was found that 10.0 μl of 2.0 M KI solution were the optimum values for volume and concentration of the enhancer solution.

pH Influence: To test the influence of pH on the analytical signal, sodium hydroxide and hydrochloric acid solutions at different concentration levels were used to adjust the pH. Figure 3 shows the results obtained. As a consequence of this experiment, a basic medium produced by 0.5 M NaOH was selected as optimum pH. At this pH value the analyte forms a water-soluble sodium salt from the acidic enol group.

Different volumes (1.0 to 14.0 μl) of 0.5 M NaOH solution were tested to study its influence on the phosphorescence intensity. It was found that the analytical signal increases when the volume of NaOH solution increases between 1.0 and 10.0 μl and remains constant from this value. Ten microliters was selected as optimum.

Sample Volume: The influence of the sample volume spiked on the paper was studied in a range of 1.0 to 10.0 μl , using a solution $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ of warfarin. It was found that 2.5 μl of sample solution was the optimum value.

Influence of the Drying Time of the Sample: To dry the sample, two procedures were tested: a hot air-dried flow produced by a hair drier, and the radiation emitted from an infrared heat lamp. The best results were obtained drying the sample with a hot air flow, placing the hair drier 10 cm above the sample, with a power of 500 W, for 3 min. Higher times than 3 min did not increase the phosphorescence intensity, whereas for times shorter than 3 min the sample was not dried and the phosphorescence intensity decreased. Three minutes drying time was thus selected as optimum.

Order of Addition of the Reagents: All possible sequences were tested. It was found that the sequence NaOH, heavy ion, analyte was the most appropriate, as shown in Table 1.

Oxygen Influence: Because the phosphorescence measurements are influenced by the quenching effect produced by atmospheric oxygen, thus bringing about a decrease in the phosphorescence intensity, a dried-nitrogen atmosphere was used in the sample compartment to avoid this effect. We also attempted to diminish this effect by placing the sample between two quartz plates, as shown in Figure 1, to realize the phosphorescence measurements and obtain the results shown in Table 2 and Figure 4.

From these results it can be deduced that: (1) Using the quartz plates, the initial relative phosphorescence intensity (sample signal—blank signal) was six times higher than without quartz plates, with or without a nitrogen atmosphere. (2) The initial phosphorescence intensity remains constant for up to 8 min with a nitrogen atmosphere and up to 5 min without nitrogen. Hence, if the measurements of phosphorescence are performed no later than 5 min from the preparation of the sample, the nitrogen atmosphere is not even necessary. Later experiments were thus performed under these experimental conditions.

Materials and Methods

Instruments and Software

A Perkin-Elmer LS-50 luminescence spectrometer in phosphorescence mode, equipped with a xenon discharge lamp (power equivalent to 20 kW during 8 μ s) and pulse width at half peak height $< 10 \mu$ s, was used to perform the phosphorescence measurements. The spectrometer, equipped with a Hamamatsu R298 photomultiplier, two Monk-Gillieson F/3 monochromators, and a Braun Melsungen Thermomix thermostat Model 1441, was interfaced to a PS/230-386 microcomputer through a RS232C connection. The Perkin-Elmer FL Data Manager software package was used for the acquisition and manipulation of the spectral data. The spectrometer was checked daily by means of a P1 solid standard containing Europium (III) thenoyltrifluoroacetate dissolved in a (12.5 \times 12.5 \times 45 mm) transparent matrix of polymethylmethacrylate supplied by Perkin-Elmer. To perform the phosphorescence measurements, two (45 \times 12 \times 1 mm) rectangular Hellma Suprasil quartz plates were used. Other accessories were: a 10- μ l in-tray Biohit Proline micropipette, a Crison digital pH meter with combined glass-saturated electrode, a Selecta ultrasonic bath, and a Braun Model Silencio 1600 (max power 2,000 W) hair drier. The statistical calculations were carried out using the Statgraphics software package (Statgraphics 1992).

Reagents

Stock solution (100 mg \cdot L⁻¹) of warfarin was prepared in absolute ethanol, from the standard supplied by Aldrich Chemicals, and more diluted working solutions were obtained by appropriate dilution with water, maintaining a 10% (v/v) ethanol/water in all instances. Aqueous stock solutions of TlNO₃, Pb(CH₃-COO)₂, KCl, KBr, NaF, KI, and AgNO₃ were also prepared from the respective salts supplied by Merck. All reagents were of analytical reagent grade unless stated otherwise and the water was reverse osmosis quality water (Milli-Ro 12 plus Milli-Q Station from Millipore).

Phosphorescence Measurements

Diffuse transmitted phosphorescence intensity was adopted as an analytical signal. The phosphorescence measurements were performed, at $\lambda_{em} = 467$ nm and $\lambda_{ex} = 315$ nm, with a delay time (t_d) of 0.1 ms and a gate time (t_g) of 12 ms, placing the sample in the position shown in Figure 1. 45° was the optimum angle formed between the sample plane and the excitation beam (Capitán-Vallvey *et al.* 1998).

General Procedure

On a strip of Whatman No. 4 filter paper, 10 μ l of 0.5 M NaOH solution, 10 μ l of 2 M KI solution, and 2.5 μ l of sample solution containing between 0.3 and 4.0 mg \cdot L⁻¹ of warfarin, in this order, were spotted. Then, the filter paper with the reagents was dried for 3 min by means of a hot air stream generated by the hair drier placed 10 cm over the sample. Next, the solid support was placed between two quartz plates and put into the sample compartment of the spectrometer. The phosphorescence measurements were carried out as described in the section on Phosphorescence Measurements above.

Treatment of the Samples

Natural, sea, tap, and waste waters were filtered through cellulose filter paper, collected in a glass container, and then stored at 4°C until

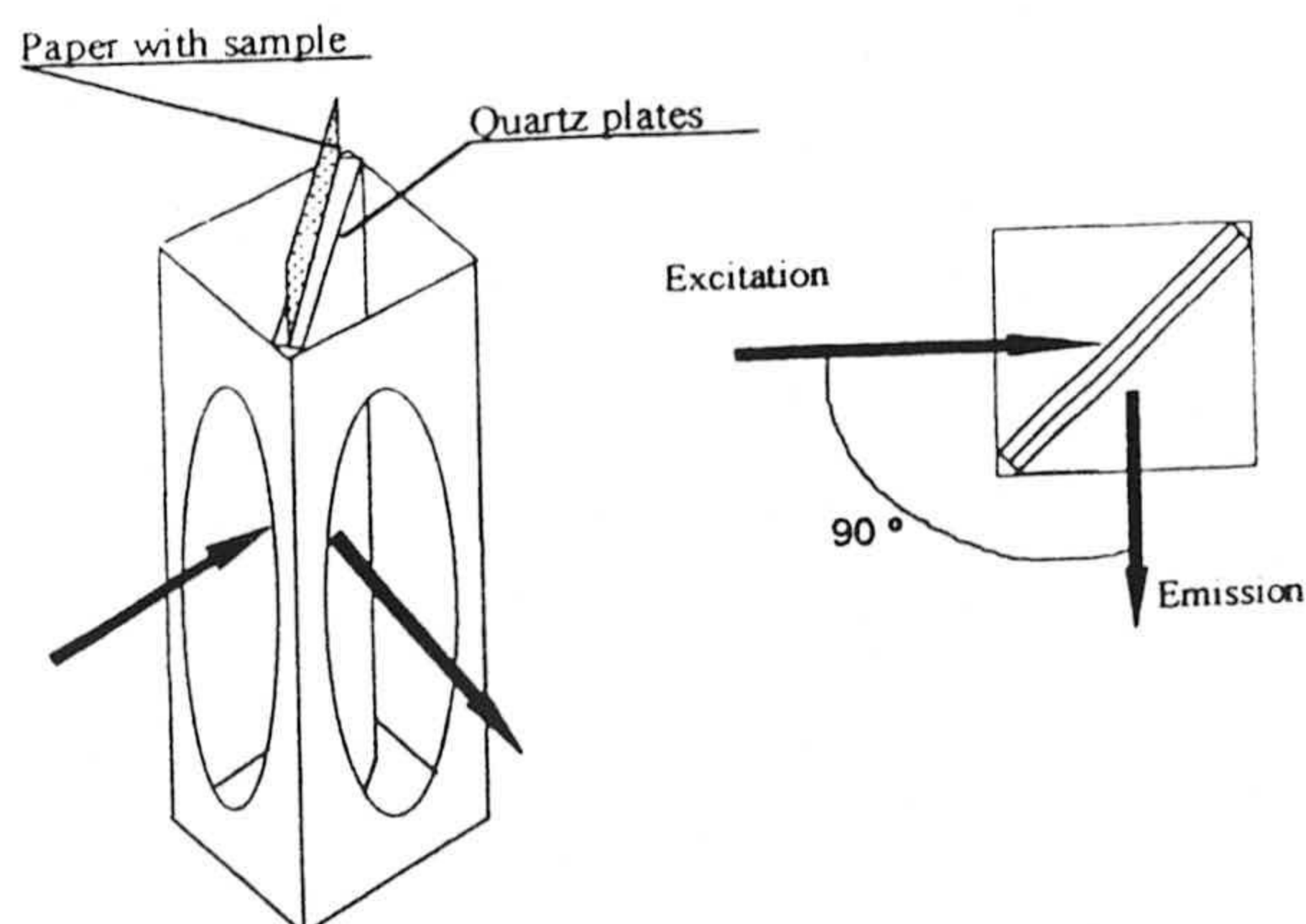


Fig. 1. Positioning of the sample in the instrument holder

analysis (APHA 1981). In the case of human plasma, the blood was ultracentrifuged and the serum was separated, and 3.0 ml of Na₂SO₄ saturated solution for each 1 ml of serum were added. The solution was shaken for 1 min, and the precipitate that appeared was separated by filtration. The serum filtered was stored (at -20°C) until analysis.

Results and Discussion

Spectral Characteristics

Warfarin in solution shows fluorescence at $\lambda_{ex} = 309$ nm and $\lambda_{em} = 380$ nm. Using filter paper as solid support and iodide as heavy ion, a phosphorescence emission centered at 467 nm, with maximum excitation at 315 nm, was observed. A blank, prepared in the same way and containing all reagents except warfarin, showed a similar spectrum, but with lower phosphorescence intensity (Figure 2). The ratios between the phosphorescence intensities of the sample and the blank were 1.5 for 0.3 mg \cdot L⁻¹ level of warfarin and 6.0 for 4.0 mg \cdot L⁻¹.

Support and Enhancer Selection

Rectangular strips (45 \times 12 mm) of different kinds of paper (anionic DE-81, cationic PE-81, Whatman No. 4 and Albet No. 235 filter paper), and different enhancers (TlNO₃, Pb(CH₃-COO)₂, KCl, KBr, KI, NaF, and AgNO₃) were tested. In each test a sample with warfarin and a blank were measured and their phosphorescence intensities were compared. The best results were obtained when 2 M KI as an enhancer and Whatman No. 4 filter paper as a solid support were used. In this case, the largest difference between the signals emitted from the sample and the corresponding blank was found. The differences were 276 for DE-81, 250 for PE-81, 385 for Whatman No. 4, and 235 for Albet, using KI as enhancer in all cases. Whatman No. 4 and KI were selected for later experiments.

Optimization of Experimental Parameters

To optimize the values of the experimental parameters influencing the phosphorescence signal, delay (t_d) and gate (t_g) times,

Determination of Warfarin in Waters and Human Plasma by Solid-Phase Room-Temperature Transmitted Phosphorescence

L. F. Capitán-Vallvey, M. K. A. Deheid, R. Avidad

Department of Analytical Chemistry, University of Granada, 18071 Granada, Spain

Received: 19 June 1998/Accepted: 11 January 1999

Abstract. A new method for the determination of warfarin in waters and human plasma using solid-phase room-temperature phosphorescence is proposed. The sample was spotted on Whatman No. 4 filter paper, together with iodide and NaOH solutions, after which it was dried and its transmitted phosphorescence intensity measured at 467 nm using two quartz plates to avoid the quenching effect produced by oxygen. The applicable concentration range went from 0.3 to 4.0 mg · L⁻¹, and the detection and quantification limits were 0.08 and 0.28 mg · L⁻¹ respectively. The precision of the method, as a relative standard deviation, was 2.3%. The method was applied in the determination of warfarin in human plasma and different types of water. The interferences produced by the albumin of the human plasma were eliminated by the addition of Na₂SO₄ saturated solution. Recoveries ranging between 93.0 and 109.0% in the case of water samples, and between 95.0 and 103.0% in the case of human plasma, were obtained. These results were compared with the results obtained by other methods.

Warfarin [4-hydroxy-3-(3-oxo-1-phenylbutyl)-2-benzopyran-2-one] is a chemical used as a pesticide, to control the population of rats and other rodents, and as an anticoagulant *in vivo* to prevent thrombosis, auricular fibrillation, and congestive heart failure. The maximum advisable therapeutic concentration in blood is 2.0 mg · L⁻¹. Concentration levels higher than 2.0 mg · L⁻¹ can produce hemorrhages, anorexia, nausea, diarrhea, colic, hepatitis, and other discomforts and side effects. Therefore, its determination in human plasma, natural water, or drinking water is needed.

Warfarin shows a natural luminescence, which enables its fluorimetric or phosphorimetric determination. Fluorimetrically, it can be determined in solution, directly (Hollifield and Winefordner 1967; Corn and Berberich 1967) or by forming an inclusion complex with β-cyclodextrin (Márquez *et al.* 1990), or in solid phase (Vilchez Quero *et al.* 1996). Phosphorimetrically it can be determined in solid phase at room temperature (Syang Yang *et al.* 1984; Vanelli and Schulman 1984). Spectro-

photometric (Fishwich and Taylor 1967; Welling *et al.* 1970) and chromatographic (Hunter 1985; Steyn *et al.* 1986) methods have been also proposed for the determination of this analyte at concentration levels of 200.0 μg · L⁻¹ in the case of spectrophotometric methods and 1.0 μg · L⁻¹ using chromatographic methods. These levels of concentration are acceptable for the determination of warfarin in human plasma or water. However, the main drawbacks of these methods in the analysis of real samples are the interferences produced by the components of the matrix, mainly when the matrix is human plasma.

Room-temperature phosphorescence is a sensitive and selective analytical technique used for the determination of organic chemicals in many areas, ranging from chemical analysis to environmental control. The analytes are fixed in a solid phase (paper, silica gel, or polyvinyl alcohol:cellulose, among others) (García Álvarez-Coque *et al.* 1988; García Sánchez and Cruces Blanco 1989; Kitade *et al.* 1995), and its phosphorescence is measured in this phase or, alternatively, is measured in solution after the formation of stabilized micelles (Cline Love *et al.* 1980; Femia and Cline Love 1984; Weijun and Changson 1993). In solid phase, the measurements of phosphorescence intensity are affected by the background signal produced by the substrate that frequently limits the sensitivity of phosphorescent methods. Also, it is known that the quenching effect produced by oxygen decreases the phosphorescence signal quickly, hindering its utilization in quantitative analysis. This problem can be resolved by using a flow of dry N₂ or other inert gases in the sample compartment, or by means of chemical deoxygenation (Díaz-García and Sanz-Medel 1986; Yansheg *et al.* 1994) when the phosphorescence measurements are performed in solution. With the aim of improving solid-phase methodology, here we propose two modifications: (1) to measure the transmitted phosphorescence instead of the usual reflected phosphorescence (Capitán-Vallvey *et al.* 1998), and (2) to place the solid supports containing the analyte between two quartz plates to minimize the negative quenching effects produced by oxygen during the measurement of the phosphorescence intensity. As a consequence of this study, a method for the determination of the pesticide warfarin in water and human plasma is proposed. The method is simple, inexpensive, and selective because the potential interferences due to the matrix of the sample can be easily eliminated by the addition of sodium sulfate.

Correspondence to: R. Avidad

APÉNDICE N° 3

Titulo Determination of Warfarina in Water and Human Plasma by Solid-Phase Room - Temperature Transmitted Phosphorescence.

Autores: L. F. Capitán-Vallvey, M. K. A. Deheidel, and Ramiro Avidad.

Revista: Arch. Environ. Contam. Toxicol. 37, 1-6, (1999).

Precisely weighed amounts (approximately 50 g) of potatoes were mixed with the appropriated volumes of standard CBL solutions and then chopped and mixed for 5 min by using an electric food-mixer. Samples for the analysis were taken from this mixture.

Conclusion

A simple, inexpensive, and practical method for analyzing CBL at low levels in waters, grains, and potatoes, with an analysis time of 5 min, using chromatographic paper as the solid support and conventional instrumentation was developed. The use of two quartz plates to protect the sample hinders the quenching effect produced by atmospheric action for at least 8 min. This enables the phosphorescence measurements to be performed without the need for a dry-N₂ flow. As can be seen in Table 7, the detection limit of the method is lower than the detection limits of most other methods proposed to date.

References

- Long WJ, Su SY (1985) *Anal Lett* 18: 543–548
- Vo-Dinh T, Alak A (1987) *Appl Spectrosc* 41: 963–966
- Alak A, Vo-Dinh T (1988) *Anal Chem* 60: 596–600
- Alak A, Contilini N, Vo-Dinh T (1989) *Anal Chim Acta* 217: 171–176
- Hurtubise RJ, Ramasamy SM, Bello JM, Burreli GJ, Citta LA (1989) *ACS Symposium Ser* 383: 155–166
- Purdy BB, Hurtubise RJ (1989) *Microchem J* 39: 330–335
- Perry LM, Campiglia AD, Winefordner JD (1989) *Anal Chim Acta* 61: 2328–2330
- Aaron JJ, Campiglia AD, Winefordner JD (1990) *Anal Chim Acta* 236: 257–265
- Santana Rodríguez JJ, Hernández García J, Bernal Suarez MM, Martín-Lázaro AB (1993) *Analyst* 118: 917–921
- Wei YS, Jin WJ, Zhu RH, Liu CS, Zhang SS (1994) *Talanta* 41: 1617–1621
- Paynter RA, Wellons SL, Winefordner JD (1974) *Anal Chem* 46: 736–739
- Bateh RP, Winefordner JD (1982) *Talanta* 29: 713–717
- Su SY, Bolton DL, Winefordner JD (1983) *Chem Biomed Environm Instrum* 12: 55–64
- McAleese DL, Dunlap RB (1984) *Anal Chem* 56: 600–601
- Campiglia AD, de Lima CG (1987) *Anal Chem* 59: 2822–2827
- Vo-Dinh T (1984) *Room Temperature Phosphorimetry for Chemical Analysis*. Wiley, New York, 1st ed
- Hurtubise RJ (1981) *Solid Surface Luminescence Analysis: Theory, Instrumentation and Applications*. Dekker, New York, 1st ed
- De Lima CG, Andino MM, Winefordner JD (1986) *Anal Chem* 58: 2867–2870
- Simeone MC, Campiglia AD (1994) *Anal Chim Acta* 287: 89–94
- Statgraphics v. 6.0 Manugistics Inc. and Statistical Graphics Corporation (1992) USA
- American Public Health Association (1981) *American Water Works Association and Water Pollution Control Federation. Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water*, 15 edn, APHA, Washington DC
- Vílchez JL, Avidad R, Navalón A, Rohand J, Capitán-Vallvey LF (1993) *Intern J Environ Anal Chem* 53: 139–149
- Analytical Methods Committee, Analytical Division (1994) *Analyst* 119: 2363–2369
- IUPAC, Nomenclature (1976) *Pure Appl Chem* 45: 105 and (1978) *Spectrochim Acta* 33B: 242
- Analytical Methods Committee (1978) *Analyst* 112: 199 and (1988) *Analyst* 113: 1469
- Guidelines for Data Acquisition and Data Quality Evaluation (1980) *Anal Chem* 52: 2242
- Larkin MJ, Day MJ (1979) *Anal Chim Acta* 108: 425–427
- Sánchez FG, Cruces Blanco C (1990) *Talanta* 37: 573–578
- Krause RT (1978) *J Chromatogr Sci* 16: 281–288
- Hill KM, Hollowell RH, Dal Cortivo LA (1984) *Anal Chem* 56: 2465–2468
- De Kok A (1987) *Chromatographia* 24: 280–283
- Yutaka Y (1990) *Suishitsu Odaku Kenkyu* 13: 189–192
- Celeste de Matos LEM (1991) *Rev Port Farm XLI*(2)
- Marvin CH (1990) *Anal Chem* 62: 1495–1498
- Lawrence JF, Leduc R (1978) *J Assoc Off Anal Chem* 61: 872–874
- Junk GA, Richard JJ (1988) *Anal Chem* 60: 451–454
- Lewis DL, Paris DF (1977) *J Agr Food Chem* 22: 148–152
- Ragab MTH (1997) *Anal Lett* 10: 551–554
- Weyer LG (1974) *J Assoc Off Anal Chem* 57: 778–781
- Nagasawa K, Uchiyama H, Ogamo A, Shinozuka T (1977) *J Chromatogr* 144: 77–80
- Brooks MW, Tessier D, Soderstrom D, Jenkins J, Clark J, Marshall J (1990) *Chromatogr Sci* 28: 187–189
- Kendrick PN, Trim JA, Atwal J, Brown PM (1991) *Bull Environ Contam Toxicol* 46: 5–10
- Handa SK, Dikshit AK (1979) *Analyst* 104: 1185–1188
- Sastry CSP, Vijaya D, Mangala DS (1987) *Analyst* 112: 75–78
- Panadero S, Gomez-Henz A, Perez Bendito D (1994) *Anal Chem* 66: 919–923

Table 2 includes the values of phosphorescence intensity emitted by the samples and the corresponding blanks 1, 3, 5 and 8 min after preparation under different experimental conditions. If the phosphorescence intensity is measured in under 8 min after sample preparation a dry and inert atmosphere is not necessary. We selected 2 min as the working time.

Analytical parameters

The method was calibrated using three replicates of eight standards ranging from 0.5 to 4.0 $\mu\text{g/mL}$. The calibration graphs were found to be linear using the lack-of-fit test as suggested by the Analytical Methods Committee [23]. The linear dynamic range was calculated by means of the equation $\text{LDR} = 0.1(L_u - L_l)$, when L_u and L_l are the upper and lower limits, respectively, of the calibration graph. The IUPAC detection limit [24] and the quantification limit [25, 26] were determined from the standard deviation of a series of ten individually prepared blanks. The repeatability of the method (expressed as standard deviation) was tested with two series of ten samples each with a CBL content of 1.0 $\mu\text{g/mL}$ or 3.0 $\mu\text{g/mL}$, respectively. These and other analytical parameters are summarised in Table 3.

Interferences

The species that could potentially produce interference were tested at a concentration level of 25.0 $\mu\text{g/mL}$ and,

if interference occurred, the concentration was reduced until the foreign species produced an error not exceeding $\pm 5.0\%$ in the determination of the analyte. Table 4 shows the results obtained. It is remarkable that 1-naphthol (hydrolysis product of the CBL) only produced interferences exceeding $\pm 5.0\%$ when its concentration level was higher than 10.0 $\mu\text{g/mL}$. This may be due to the different location of the peaks in the emission spectra of CBL ($\lambda_{\text{em}} 486 \text{ nm}$) and 1-naphthol ($\lambda_{\text{em}} 498 \text{ nm}$), and the ten-times different phosphorescence intensities of these peaks.

Applications

The proposed method was applied to the determination of CBL in wheat, rice, potatoes, and tap, sea, raw and natural waters. Fortunately, the waters and foods analyzed are either free of CBL contamination or perhaps at lower concentration than the detection limit. Therefore, a recovery study was carried out with standard solutions of CBL. The results obtained from this recovery study are summarized in Tables 5 and 6.

Weighed amounts of cereal (about 30 g) were spiked by soaking for 24 h in ethanolic solutions of CBL, whose concentrations were known (0.5, 2.0 or 4.0 $\mu\text{g/mL}$). The grains of cereal were separated from the solution and dried in the natural conditions of the laboratory to constant weight. Aliquots of these samples were taken for analysis.

Table 7 Methods for the determination of Carbaryl

Technique	Detection	Matrix	DL ^a ($\mu\text{g/L}$)	Reference
✓CF ^a	FL ^b	Water	170.0	27
✓CF ^a	FL ^b	Serum	1.0	28
HPLC ^c	FL ^b	Water	1000.0	29
HPLC ^c	FL ^b	Water	0.8	30
HPLC ^c	FL ^b	Fruits	500.0	31
HPLC ^c	FL ^b	Water	0.1	32
HPLC ^c	UV ^d	Juices	2.0	33
HPLC ^c	UV ^d	Water	200.0	34
HPLC ^c	UV ^d	Potatoes	–	35
GC ^e	EC ^f	Water	10.0	36
GC ^e	EC ^f	–	200.0	37
GC ^e	EC ^f	–	1.0	38
GC ^e	EC ^f	–	200.0	39
GC ^e	EC ^f	–	5.0	40
GC ^e	NPD ^g	Water	1.0	41
GC ^e	NPD ^g	Honey	–	42
SP ^h	VIS ⁱ	Water	100.0	43
SP ^h	VIS ⁱ	Water, Grains, Formulations	700.0	44
SPS ^k	FL	Water	0.1	22
RTP ^l	PH ^m	–	10.0	45
RTP ^l	PH ^m	Water	40.2	10
RTP ⁱ	PH ^m	Water, Grains, Potatoes	90.0	This Method

^aDetection limit; ^dConventional fluorescence; ^bFluorescence detection; ^cHigh-performance liquid chromatography; ^dUltraviolet detection; ^eGas chromatography; ^fElectronic capture; ^gNitrogen and phosphorus detector; ^hConventional spectrophotometry; ⁱVisible; ^kSolid phase spectrofluorimetry; ^lRoom temperature phosphorescence; ^mPhosphorescence

Table 3 Analytical parameters

Intercept	1.410
Slope	64.83
PL (%) ^a	11.60
LDR (μg/mL) ^b	0.35
L _u -L _l (μg/mL) ^c	0.5-4.0
Detection limit (μg/mL)	0.09
Quantification limit (μg/mL)	0.31
RSD (%) ^d	2.3

^a Probability level of the lack-of-fit test^b Linear dynamic range^c L_u and L_l: Upper and lower limits of the calibration graph^d Relative standard deviation**Table 4** Effects of foreign species or ions on the determination of CBL (2.0 μg/mL)

Species or ions	Tolerance level (μg/mL)
Dichlone, Captan, Lindane,	> 10.0
Humic Acids	> 10.0
1-Naphthol	10.0
Warfarin	2.0
Thiabendazole	1.0
Cl ⁻ ; SO ₄ ²⁻ ; PO ₄ ³⁻ ; NO ₃ ⁻	> 25.0
Al(III); Cu(II); Mg(II); Ca(II)	> 25.0
Fe(III)	15.0

Table 5 Recovery study of CBL in foods

Matrix	Added (μg/mL)	Found (μg/mL)	Recovery (%)
Rice	1.00	0.929	92.9
	1.00	1.033	103.3
	1.00	0.979	97.9
	2.00	1.992	99.6
	2.00	1.884	94.2
	2.00	1.946	97.3
	4.00	3.708	92.7
	4.00	3.920	98.0
	4.00	3.864	96.6
Wheat	1.00	0.940	94.0
	1.00	1.022	102.2
	1.00	0.968	96.8
	2.00	1.984	99.2
	2.00	1.884	94.2
	2.00	1.964	98.2
	4.00	3.692	92.3
	4.00	3.912	97.8
	4.00	3.804	95.1
Potato	1.00	1.047	104.7
	1.00	0.949	94.9
	1.00	0.985	98.5
	2.00	1.806	90.3
	2.00	1.946	97.3
	2.00	1.912	95.6
	4.00	3.720	93.0
	4.00	3.876	96.9
	4.00	3.776	94.4

It is well known that the main problem in phosphorescence measurements, for the determination of analytes, is the negative effect produced by oxygen and moisture. The phosphorescence intensity decreases quickly if this effect is not hindered. We used two quartz plates to protect the sample. In order to obtain comparative data, we performed the following experiments: four samples (2.0 μg/mL of CBL) were measured, with and without quartz plates and in the presence and absence of a dry-N₂ flow, for 60 min. Four blanks, identically prepared, were also measured in the same way as the samples. Fig. 5 shows that phosphorescence intensities measured with quartz plates, and with or without N₂, are both very similar, and are higher (around 100 units) than the signal produced by the sample when quartz plates are not used.

Table 6 Recovery study of CBL in different waters

Matrix	Added (μg/mL)	Found (μg/mL)	Recovery (%)
Mineral water (Lanjarón, Granada)	1.00	0.989	98.9
	1.00	0.976	97.6
	1.00	1.022	102.2
	3.00	3.097	103.2
	3.00	2.910	97.0
	3.00	2.850	95.0
	1.00	0.952	95.2
	1.00	0.976	97.6
	1.00	1.020	102.0
Mineral water (Font Vella, Gerona)	3.00	3.027	100.9
	3.00	2.910	97.0
	3.00	3.074	102.5
	1.00	0.965	96.5
	1.00	1.046	104.6
	1.00	0.999	99.9
	3.00	3.003	100.1
	3.00	2.910	97.0
	3.00	3.097	103.2
Tap water (Granada city)	1.00	0.952	95.2
	1.00	1.046	104.6
	1.00	0.999	99.9
	3.00	3.097	103.2
	3.00	2.864	95.5
	3.00	3.004	100.1
	1.00	1.022	102.2
	1.00	0.976	97.6
	1.00	0.987	98.7
Natural water (River Genil, Granada)	3.00	3.050	101.7
	3.00	3.004	100.1
	3.00	2.988	99.6
	1.00	1.014	101.4
	1.00	0.969	96.9
	2.00	1.920	96.0
	2.00	2.001	100.0

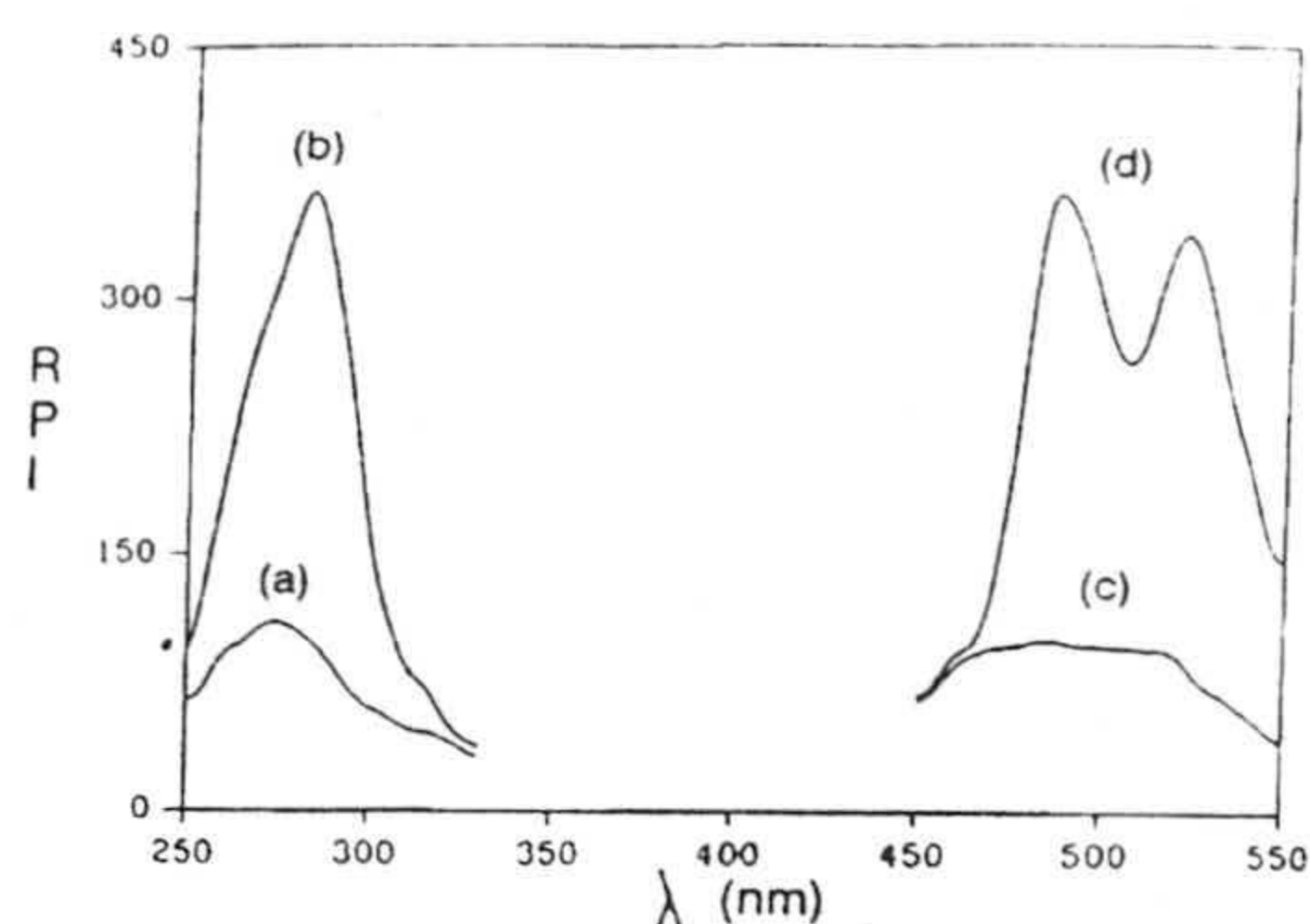


Fig. 3 a), b) Excitation spectra of blank and CBL (2.0 $\mu\text{g/mL}$), respectively; c), d) Emission spectra of blank and CBL (2.0 $\mu\text{g/mL}$), respectively

Table 1 Influence of the solid supports on the phosphorescence intensity

Paper	Whatman No 4	Albet	P-81	DE-81
Sample (S)	440	490	273	376
Blank (B)	88	290	196	226
Difference (S-B)	352	200	77	150

using Tl(I) as the heavy atom. From results in Table 1 it is clear that Whatman No. 4 presents a major difference between the signals produced by the sample and the blank.

Solutions of Pb(II) acetate, Tl(I) and Ag(I) nitrates, KI, KBr, KCl and NaF, at different concentration levels, were tested as enhancers of the phosphorescence. It was found that Pb(II) and Tl(I) are the ions that produce the strongest phosphorescence (280 in both cases after subtraction of the blank); Ag(I) does not enhance the phosphorescence and the halide ions induce phosphorescence intensities that decrease with the atomic mass of the element (280, 85, 28, and 19 for iodide, bromide, chloride and fluoride, respectively). Tl(I) was selected as the heavy atom for the next experiments.

Experimental conditions

To test the influence of pH on the phosphorescence, sodium hydroxide and hydrochloric acid solutions at different concentration levels were used. CBL presents phosphorescence at pH values ranging between 2.0 and 8.0 (Fig. 4). Hydrolysis starts at pH > 8.0, and is complete at pH = 11.0 [22] producing 1-naphthol which does not produce phosphorescence.

The influence of the concentration of the heavy atom on the phosphorescence of CBL was tested using TlNO_3 solutions of different concentrations ranging between 0.1 mol/L and 0.5 mol/L. The best results were obtained with a 0.5 mol/L saturated solution. Next, with a 0.5 mol/L TlNO_3 solution, different volumes of solution (from 1.0 to 20.0 μL) were tested. It was found that the phosphorescence intensity increases between 1.0 and 15.0 μL , re-

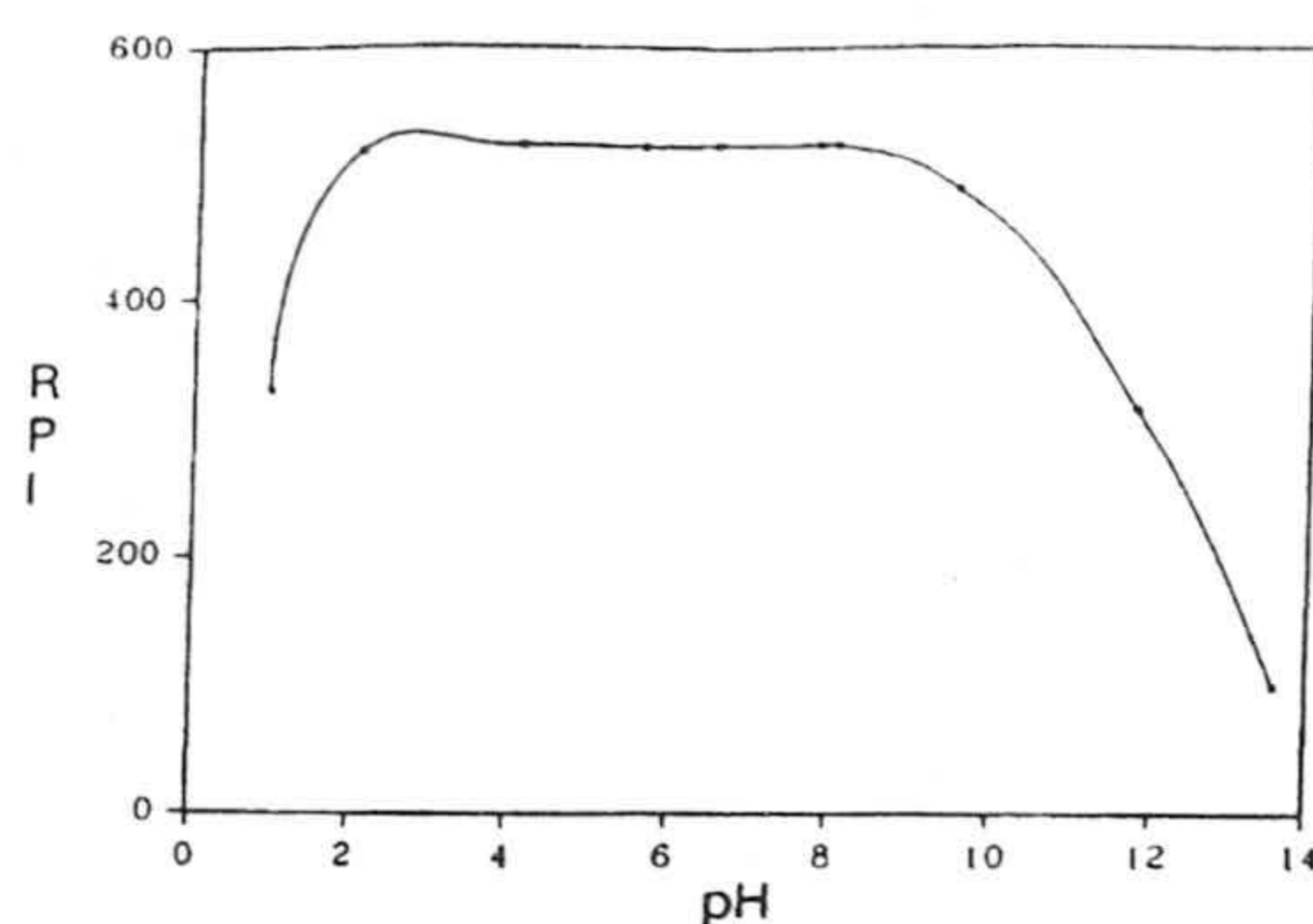


Fig. 4 Influence of pH on the phosphorescence intensity of CBL (2.0 $\mu\text{g/mL}$)

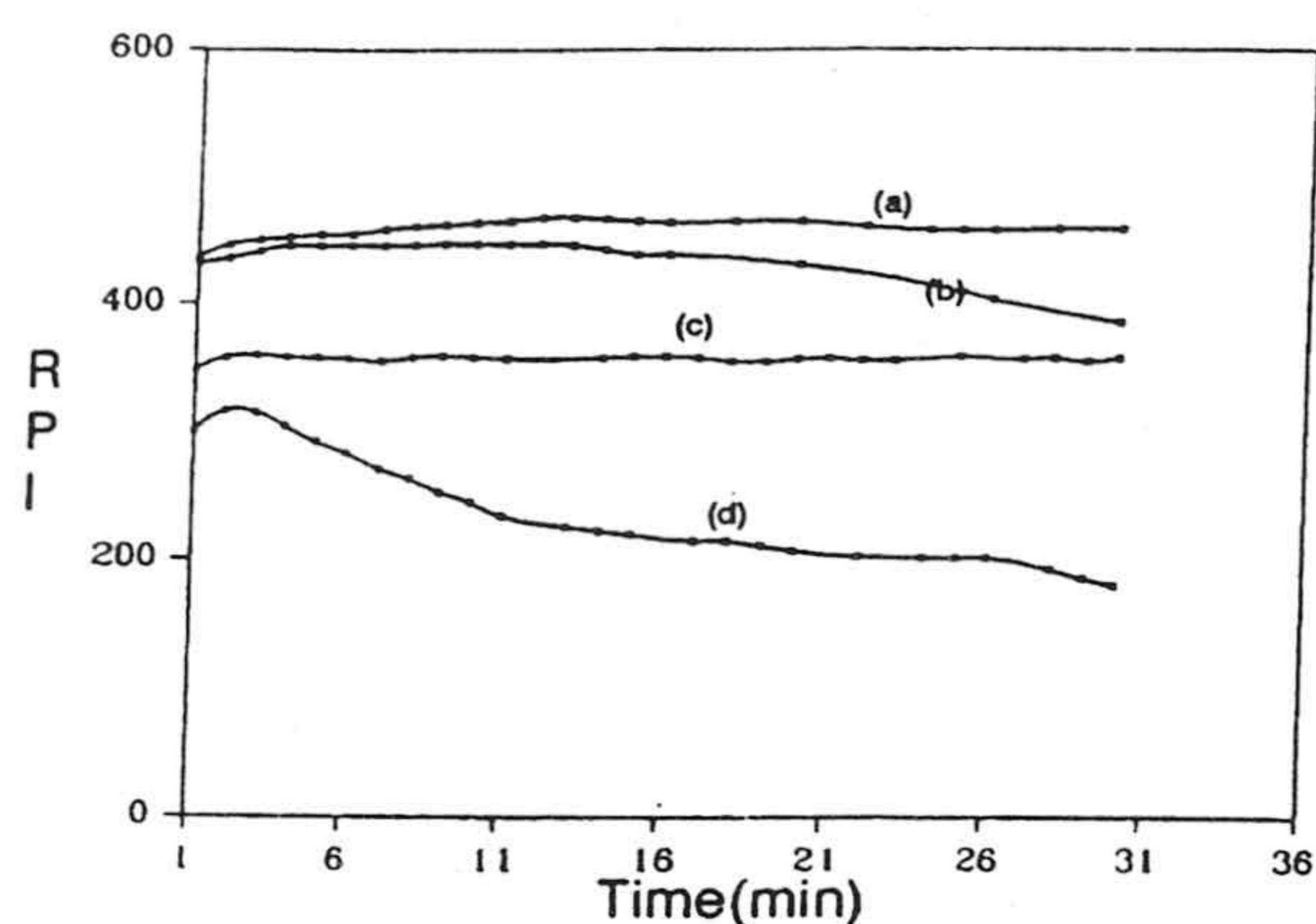


Fig. 5 Influence of the time on the phosphorescence intensity of CBL (2.0 $\mu\text{g/mL}$). With quartz plates: (a) with N_2 and (b) without N_2 . Without quartz plates: (c) with N_2 and (d) without N_2

Table 2 Phosphorescence intensity of CBL samples under different conditions

Time from sample preparation	Phosphorescence intensity ^a			
	A	B	C	D
1 min	437	348	432	300
3 min	451	360	442	315
5 min	455	358	446	292
8 min	461	358	446	263

^aThese values are the results of three independent determinations

A: With both nitrogen and quartz sheets
 B: With nitrogen but not with quartz sheets
 C: With no nitrogen but with quartz sheets
 D: With neither nitrogen nor quartz sheets

maining constant for higher values. 15.0 μL and 0.5 mol/L were selected.

Using a solution (2.0 $\mu\text{g/mL}$) of CBL in 10% (v/v) ethanol/water different volumes of sample were checked. The maximum phosphorescence intensity was obtained for 3.0 μL of sample.

Proline micropipette. Other accessories used were: a Crison digital pH-meter with combined glass-saturated electrode, a Braun Silencio 1600 hair drier (max power 2000 W), a Braun, Melsungen, Thermomix 1441 thermostat, a basic Kika Labortechnik Eurostar agitator, a Heidolph Type W-1 rotary evaporator and a Selecta ultrasonic bath. The Statgraphics software package [20] was used for statistical calculations.

Reagents

A stock solution of CBL (100 µg/mL) (Riedel-de-Haën) was prepared by exact weighing of the standard and dissolution in absolute ethanol and was stable for two weeks. Working solutions were prepared daily by dilution with reverse osmosis quality water (Milli-Ro 12 plus Milli-Q Station from Millipore) maintaining 10% (v/v) ethanol/water to avoid the precipitation of the analyte.

Stock aqueous solutions of heavy atoms were prepared at different concentration levels from TiNO_3 , $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, AgNO_3 , KI , KBr , KCl and NaF standards (Merck), all of analytical reagent grade unless stated otherwise.

Whatman No. 4 filter paper, Albet 235 filter paper, Whatman DE-81 anionic exchanger paper, and Whatman P-81 cationic exchanger paper without pre-treatment were tested as solid supports.

Sample preparation and phosphorescence measurements

The paper used as solid support was cut into strips (45 × 12 mm) and placed into the home-made accessory shown in Fig. 1.

With the aid of the micropipette, the required volumes of reagents were spotted on the area delimited for the accessory, after which the paper containing the reagents was dried for 3 min using the hair-drier at 7 cm distance. The relative phosphorescence intensity was measured 2 min after the insertion of the sample between the quartz plates in the sample compartment of the spectrometer, in the position shown in Fig. 2.

Measurements of the diffuse transmitted phosphorescence intensity (DTPI) (emitted from the unexcited surface of the sample) were performed at $\lambda_{\text{em}} = 486 \text{ nm}$ (with $\lambda_{\text{exc}} = 282 \text{ nm}$), with a delay time and gate time of 0.1 and 12 ms, respectively. Slit widths were 2.5 nm for excitation and 5.0 nm for emission.

Procedures

Basic procedure. On a strip of Whatman No 4 filter paper, 15.0 µL of 0.5 mol/L TiNO_3 aqueous solution and 3.0 µL of sample solution containing between 0.5 and 4.0 µg/mL of CBL were spotted. Then the sample was treated and its phosphorescence was measured as above. A blank containing all reagents except CBL was prepared, treated and measured in the same way.

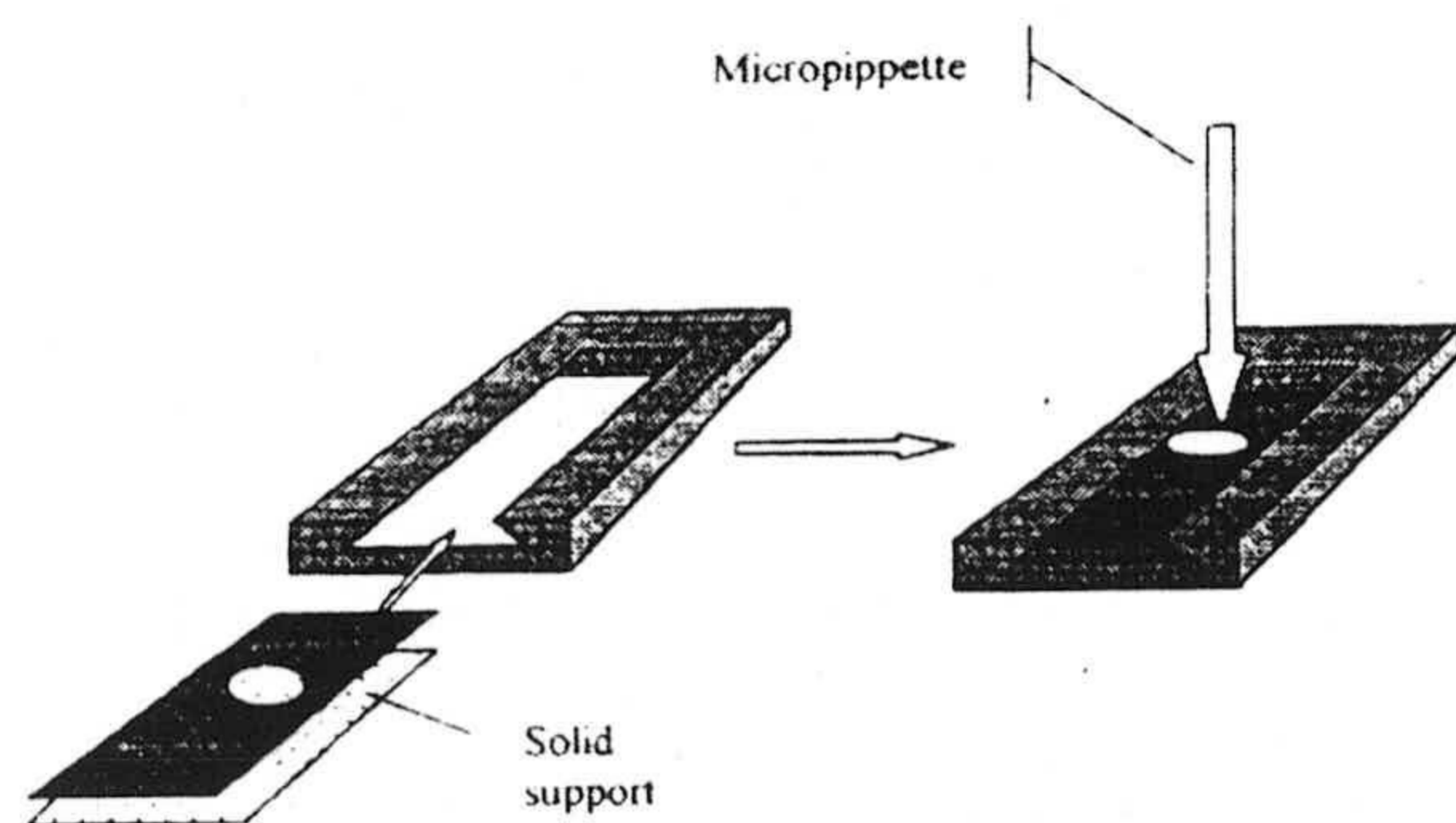


Fig. 1 Device for deposition of the sample solution on the solid support

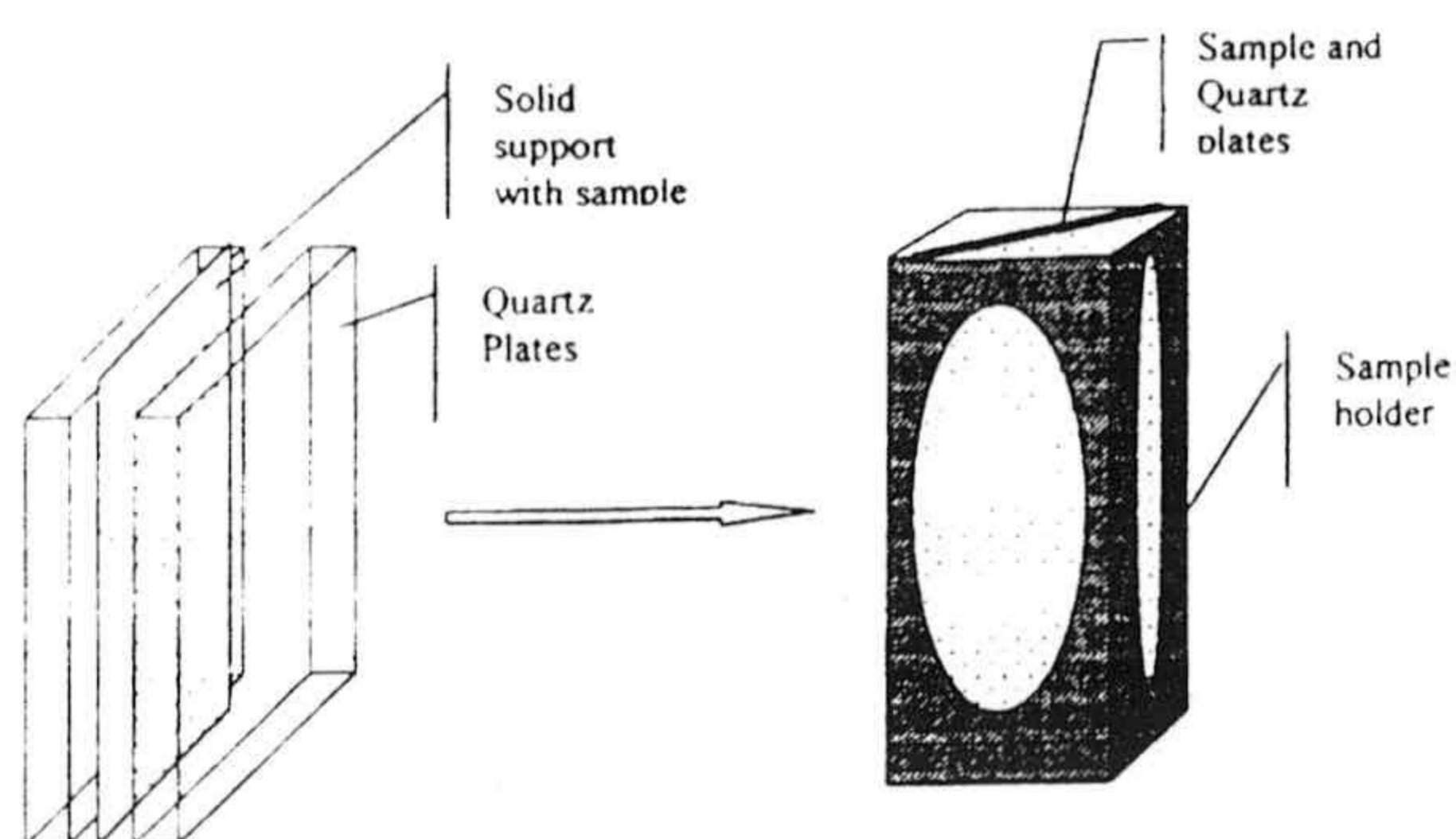


Fig. 2 Placing the solid support with the sample and the quartz plates into the sample holder

Procedure for water samples. The suspended organic matter in the water samples was filtered out using a cellulose filter paper, pore size 0.45 µm (Millipore), and collected in a glass container previously cleaned with nitric acid, taking the usual precautions to avoid contamination [21]. These samples were treated and measured as described above.

Procedure for cereal and potato samples. 10 g of sample, or an amount that contains between 1.25 and 10.0 µg/g of CBL, were crushed and mixed with 40 mL of absolute ethanol. The mixture was shaken at 700 rpm for 1 min and filtered through a crucible with sintered glass filter disk (10–20 µm pore diameter). The solid residue was treated with another 40 mL of ethanol repeating the operation. Finally, the solid residue was washed with 20 mL of ethanol. The three alcohol solutions (40+40+20 mL) were transferred into a rotary evaporator apparatus and concentrated to ca. 2 mL. The concentrated solution was diluted to 25 mL with reverse osmosis quality water and used as sample solution. In the case of the potato samples, if a precipitate appeared on dilution to 25 mL, the solution was filtered.

Results and discussion

Figure 3 shows the excitation and emission spectra of the CBL and blank in the range 250–550 nm, at neutral pH, using $\text{Ti}(\text{I})$ as the heavy metal. It presents two phosphorescent emission peaks at 486 and 520 nm for an excitation wavelength of 282 nm. In this figure we can see that both spectra (sample and blank) are similar but the phosphorescence intensity for the blank is lower (362/106).

Optimization

The instrumental parameters were tested in this order: delay time (t_d), gate time (t_g), excitation and emission slit widths and scan speed. t_d was tested between 0.1 and 0.5 ms maintaining 12 ms as constant value of t_g . t_g was tested between 4.0 and 13.0 ms maintaining $t_d = 0.1 \text{ ms}$. The maximum phosphorescence intensity was obtained for $t_d = 0.1 \text{ ms}$ and $t_g = 12.0 \text{ ms}$. Scan speed did not affect the phosphorescence emission; 240 nm/min was selected as the working value.

Samples and blanks on different kinds of paper, all with no pre-treatment, were prepared in three replicates

ORIGINAL PAPER

L. F. Capitán-Vallvey · Mahmoud K. A. Deheid
R. Avidad

Determination of carbaryl in foods by solid-phase room-temperature phosphorimetry

Received: 10 October 1997 / Revised: 2 February 1998 / Accepted: 7 February 1998

Abstract A phosphorimetric solid phase assay is proposed for the determination of the pesticide carbaryl (CBL) at room temperature. CBL was spotted on filter paper together with Tl(I) as heavy metal, and dried for 3 min, after which the diffuse transmitted phosphorescence was measured using two quartz plates to avoid the quenching effect produced by atmospheric oxygen. The linear dynamic range was 0.5–4.0 $\mu\text{g/mL}$ and the detection and quantification limits were 0.09 and 0.31 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The precision of the method, expressed as relative standard deviation, was 2.3% for a sample containing 2.0 $\mu\text{g/mL}$ of CBL. The method was applied to the determination of CBL residues in cereals, potatoes and waters, obtaining recoveries ranging between 92 and 105%.

Introduction

Room-temperature phosphorescence (RTP) is a luminescence phenomenon that can be used for the trace determination of a variety of organic compounds including pesticides in solution or in the solid phase. In this last case (Solid-Surface Room-Temperature Phosphorimetry (SSRTP)), a solid support (silica, alumina, filter paper, chromatographic papers or other materials) for the fixation of the phosphor, together with a heavy metal atom, is used and the diffuse reflected phosphorescence intensity is measured usually in an inert dry atmosphere [1–8]. In solution the phosphor is contained in cyclodextrin macromolecules or micellar stabilized (MSRTP) media and the quenching effect produced by the oxygen is avoided adding sulfite, or by using a flow of N_2 (or other inert gas) to remove the oxygen [9, 10].

RTP has good selectivity but, in the case of SSRTP, suffers from appreciable background signals. Several at-

tempts have been made to diminish the background signal produced by the solid supports, including chemical pre-treatment of the paper, subtraction of the background signal through the use of a computer [11–13], irradiation of the paper with ultraviolet light [14], or extraction with water in a Soxhlet apparatus [15]. The background intensity reductions obtained ranged between 86 and 94%.

The sensitivity of SSRTP can also be improved by the presence of a heavy atom, which increases the rate of the singlet-triplet intersystem crossing [16, 17], and/or surfactants i.e. sodium dodecyl sulfate. The long chain of the surfactant avoids the penetration of the phosphorescent molecules into the cellulose pores, increasing the interaction of the phosphor with the heavy atom [18, 19]. However, in all instances a flow of dry gas (He or N_2) is needed.

In this paper the RTP of the pesticide carbaryl employing different kinds of papers without pre-treatment is reported. The diffuse transmitted phosphorescence is measured by placing the paper containing the sample between two quartz plates, to avoid the quenching effect produced by atmospheric oxygen and moisture. In this form, the flow of dry inert gases is not necessary and the ratio between sample signal and background signal is enhanced. A method for the determination of CBL is proposed. The method is quick, simple, and inexpensive and good results were obtained, for the determination of the pesticide in rice, wheat, potatoes, and several types of waters.

Experimental

Apparatus and software

A Perkin-Elmer LS-50 luminescence spectrometer equipped with a xenon discharge lamp (power 20 kW, pulse width at half peak height $< 10 \mu\text{s}$) and interfaced to a PS/230-386 microcomputer was used. The instrument was calibrated using a ($12.5 \times 12.5 \times 45 \text{ mm}$) P1 solid standard of europium(III) thenoyltrifluoroacetate in polymethylmethacrylate. The Perkin-Elmer FL Data Manager software package was used. Two rectangular plates of quartz ($45 \times 12 \times 1 \text{ mm}$) supplied by Hellma Suprasil were used. The samples and other reagents were measured with a 10 μL Biohit

L. F. Capitán-Vallvey · M. K. A. Deheid · R. Avidad (✉)
Department of Analytical Chemistry, University of Granada,
E-18071, Granada, Spain

APÉNDICE N° 2

Titulo : Determinación of carbaril in foodstuffs by solid-phase room - tempereture phosphorimetry.

Autores: L. F. Capitán-Vallvey, Mahmoud. K. A. Deheidel, and R Avidad.

Revista: Fersenius. J. Anal. Chem 362, 307-312 (1998).

**DETERMINATION OF MORESTAN RESIDUES IN WATER AND
FOODSTUFFS BY TRANSMITTED ROOM TEMPERATURE SOLID
PHASE SPECTROPHOSPHORIMETRY**

Key words: Morestan determination; Residues analysis; Room temperature phosphorescence.

L.F. Capitán-Vallvey, M. Kalil Deheidell and R. Avidad*

Department of Analytical Chemistry. University of Granada, E-18071, Granada,
Spain.

ABSTRACT

A method for the determination of the pesticide morestan by means of transmitted room temperature solid phase spectrophosphorimetry has been developed. The method is based on the native phosphorescence showed by the morestan when it is fixed in a Whatman No 4 paper as a solid support. The excitation and emission wavelengths were 362 and 527 nm, respectively. The optimum phosphorescent emission was obtained when the delay time was 0.15 ms and the gate time 12.0 ms without need of a heavy atom. The linear dynamic range

* *Author for correspondence*

was between 0.1 and 1.0 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, and the detection and quantification limits were 0.03 and 0.09 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, respectively. The precision of the method, expressed as the relative standard deviation of ten samples at the 0.6 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ concentration level, was 3.0%. The method was applied to the determination of the pesticide in different type of waters, potatoes and vegetables.

INTRODUCTION

Room-Temperature Phosphorescence (RTP) is a very useful analytical technique that enables the development of sensitive and selective methods for the determination of a variety of organic compounds (pesticides, polycyclic aromatic hydrocarbons, drugs or polychlorinated biphenyls, among others) at trace levels¹⁻⁸. The analytical methods based on this luminescent technique use different methodologies for the measurement of the phosphorescence intensity emitted by the phosphor. Originally, different solid-surfaces (filter and chromatographic papers, silica gel, asbestos or alumina) were used as solid supports for the fixation of the phosphor and subsequent measurement of the phosphorescent emission. However, at present, the filter or chromatographic papers, due to their low cost and availability, are used the most. Generally, these papers are pretreated with β -cyclodextrin^{9,10}, sodium dodecyl sulfate¹¹⁻¹³, fumed silica¹⁴ or ultraviolet irradiation after a Soxhlet extraction with water¹⁵, to enhance the luminescence intensity and to reduce the background signal produced by the substrate. Using this methodology, known as Solid-Surface Room-Temperature Phosphorescence (SSRTP), many quantitative methods for the determination of different types of organic compounds have been proposed¹⁶⁻²⁰.

Recently, Micellar Stabilised Room-Temperature Phosphorescence (MSRTP) has been proposed as alternative to SSRTP. In this case, the phosphor is "innate" in rigid molecules (*i.e.* cyclodextrins) or it forms microemulsions with an emulsifier, after which the phosphorescence intensity can be measured in solution²¹⁻²⁸. In both

methodologies, different heavy ions (usually I^- , $Tl(I)$, $Pb(II)$, $Hg(I)$ or $Ag(I)$ among others) have been used as enhancers of the phosphorescence intensity.

The main problems of the methods based on SS RTP are the background signal produced by the solid substrate and the need to use a dry flow of inert gas (N_2 usually) to avoid the quenching produced by the atmospheric moisture and oxygen^{29,30}. Although these problems have been resolved by the use of pretreated solid supports, and inert gas flow during the measurement process, this involves a rise in price of the analysis and an increase of the operations needed to perform the analytical process.

With the aim of simplifying and improving the analytical process, we have carried out a study in which the solid supports (chromatographic or filter papers) are not pretreated and the quenching effect produced by the atmospheric agents is avoided using two plates of quartz. The solid support containing the sample is placed between the two quartz plates and then the transmitted phosphorescence is measured. As analyte we have selected the pesticide 6-methyl-1,3-dithiolo(4,5-b)quinoxalin-2-one, commonly named morestan or oxythioquinox, widely employed as fungicide and insecticide in commercial formulations used in the agriculture. This compound is used in many crops (mainly vegetables and potatoes) and for this reason it could be present, at trace levels, in water coming from agricultural manipulations. Morestan, which shows a native fluorescence in solution, can be determined at trace level by means of thin-layer chromatography (TLC) with fluorescence detector^{31,32}, polarography after a previous separation by TLC³³, gas chromatography^{34,35}, spectrophotometry³⁶, gas-liquid chromatography with electron capture detector³⁷⁻⁴⁰ or solid phase spectrofluorimetry⁴¹. Here we propose a simple, quick, and inexpensive method for the determination of morestan based on the phosphorescence emitted by the analyte when it is fixed in a untreated filter paper without need of a flow of inert gas. The method was satisfactorily applied to the determination of morestan in several waters and foodstuffs.

EXPERIMENTAL

Apparatus and software

A Perkin-Elmer LS-50 luminescence spectrometer equipped with a xenon discharge lamp (power 20 kW a pulse width at half peak height $< 10 \mu\text{s}$) and interfaced to a PS/230-386 microcomputer was used. The instrument was calibrated using a (12.5x12.5x45 mm) P1 solid standard of europium(III) thenoyltrifluoroacetate in polymethylmethacrylate and the Perkin-Elmer FL Data Manager software package was used to run the instrument. Other apparatus and laboratory materials were: a 10 μl Biohit Proline micropipette, a Crison digital pH-meter with combined glass-saturated electrode, two rectangular plates of quartz (45x12x1 mm) supplied by Hellma Suprasil, a Braun Silencio 1600 hair drier (max power 2000 W), a basic Kika Labortechnik Eurostar agitator, a Braun Melsungen Thermomix 1441 thermostat, a Heidolph Type W-1 rotary evaporator and a Selecta ultrasonic bath. The Statgraphics software package⁴² was used for statistical calculations.

Reagents

A stock solution ($100 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) of morestan (Riedel-de-Haën) was prepared by exact weighing of the standard and dissolution in absolute ethanol. This solution was stable for two weeks. Working solutions were prepared daily by dilution with reverse osmosis quality water (Milli-Ro 12 plus Milli-Q Station from Millipore) maintaining 10% (v/v) ethanol/water to avoid the potential precipitation of the analyte. Stock solutions of heavy ions were prepared at different concentration levels from TlNO_3 , $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{-COO})_2$, AgNO_3 , KI, KBr, KCl and NaF standards (Merck) and then dissolved in water. As solid supports Whatman No. 4 and Albet 235 filter papers, Whatman P-81 cationic and Whatman DE-81 anionic exchanger papers, were tested. These papers were cut into strips (45x12 mm) and placed into the accessory, made by us, to spot the sample (Fig 1). By means of this accessory the sample solutions were always spotted on the same area of the solid supports.

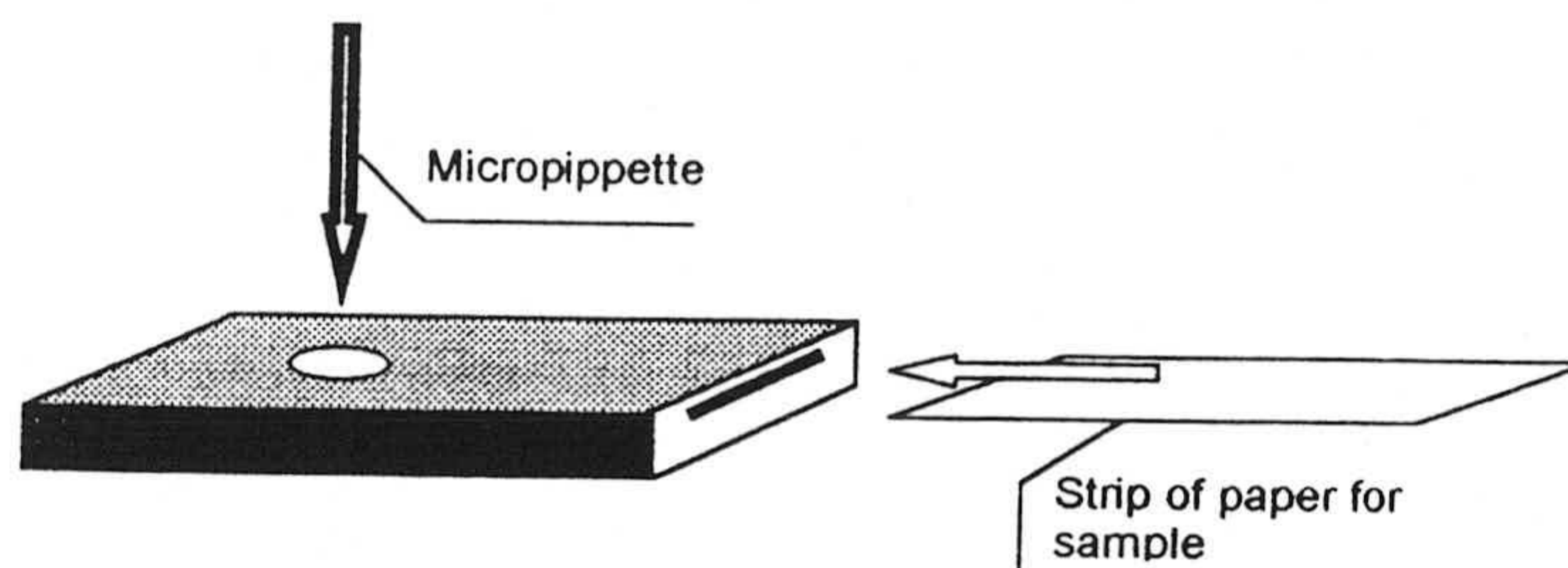


Figure 1. Accessory for deposition of the sample solution on the solid support.

PROCEDURE

Sample preparation and phosphorescence measurements

The required volumes of reagents were spotted using a micropipette onto the demarcated area of the accessory as shown in Figure 1. Next, the paper containing the reagents was dried for 3 min with a flow of hot air produced by the hair-drier, at 300 watts, situated 7 cm over the sample. Then the sample was placed between the two quartz plates and introduced into the sample compartment of the instrument to carry out the measurements of the phosphorescence intensity. These measurements were made 2 min after the preparation of the sample at $\lambda_{em} = 527$ nm with $\lambda_{exc} = 362$ nm. The analytical signal measured was the diffused transmitted phosphorescence intensity emitted from the unexcited surface of the sample, where the delay and gate times were 0.15 ms and 12.0 ms respectively. Slit widths were 5 nm for excitation and 10 nm for emission. Figure 2 shows the position of the sample in the spectrometer placed between the two quartz plates.

Basic procedure. On a strip of Whatman No 4 filter paper, 6.0 μl of sample solution containing between 0.1 and 1.0 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ of morestan were spotted. Then the sample was dried and its phosphorescence was measured as described above. A blank containing only solvent (10% ethanol/water v/v) was prepared and measured in the same way.

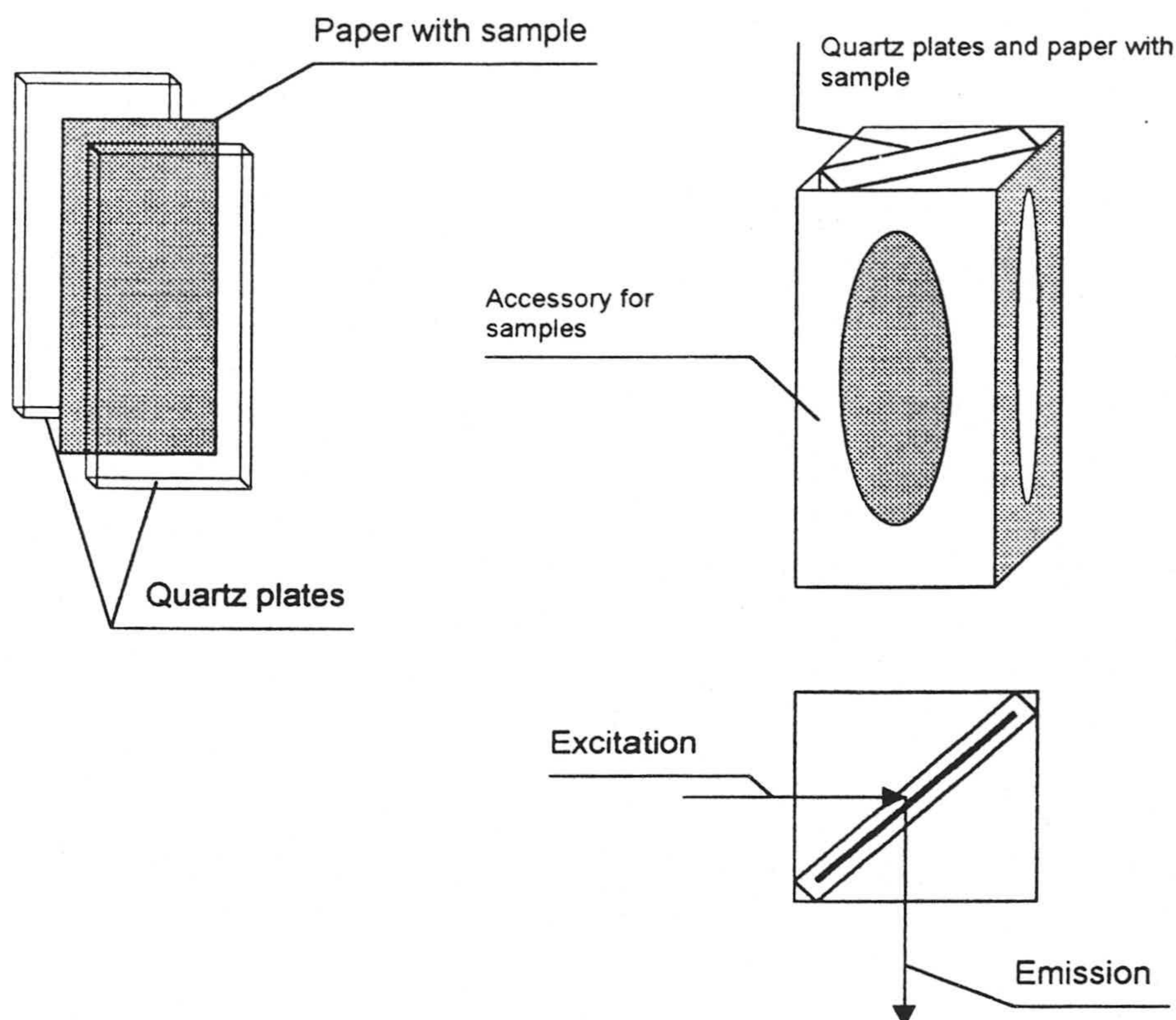


Figure 2. Position of the solid support with the sample and the quartz plates in the sample holder.

Procedure for water samples. The water samples were filtered through a cellulose filter paper (pore size $0.45 \mu\text{m}$ Millipore) to eliminate potential matter in suspension. The filtered solution was collected in a glass container previously cleaned with nitric acid taking the usual precautions to avoid contamination⁴³. The analysis of these samples was performed as described above.

Procedure for vegetable samples. An exactly weighed amount of vegetables (usually between 2 and 5 g) containing from 0.1 to $1.0 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ of morestan, was crushed and

mixed with 40 ml of acetonitrile. The mixture was shaken for 1 min at 600 rpm and filtered through a crucible with sintered glass filter disk (Millipore No 4). The solid residue was treated with another 40 ml of acetonitrile and then the operation was repeated. Finally, the solid residue was washed with 20 ml of acetonitrile and then the three organic solutions (40+40+20 ml) were transferred into a rotary evaporator apparatus and concentrated to total wastage of the solvent. The residual extract was dissolved in 2.5 ml of absolute ethanol, transferred into a 25-ml volumetric flask and raised with reverse osmosis quality water. If a precipitate appeared on dilution to 25 ml, the solution was filtered. 6 μ l of this solution were treated and measured as described in the section *Basic procedure*.

RESULTS AND DISCUSSION

Morestan fixed in the solid surface (Whatman No 4 filter paper), at neutral pH and without heavy ion, presents a native phosphorescence, the excitation and emission spectra of which are shown in Figure 3 together with the spectra of the blank. However, in order to obtain the optimum experimental conditions for the emission of the analytical signal, the following parameters were optimized: nature of the solid support and of the heavy ion, delay time (t_d), gate time (t_g), excitation and emission slit widths, scan speed, dried time, sample volume, stability of the sample vs time, percentage ethanol/water and pH of the solution.

In the first instance the ions more usually used to enhance phosphorescence were checked. With these ions (Ag(I), Tl(I), Pb(II), Hg(I), Γ Br $^-$, Cl $^-$ and F $^-$) the phosphorescence intensities were measured and compared with the phosphorescence intensity emitted by a sample without the ion. The results, expressed as (phosphorescence intensity with ion/phosphorescence intensity without ion)x100 were as follows: with Pb(II) 98.8 %, with Tl(I) 88.3%, with Cl $^-$ 92.2%, with F $^-$ 79.4 %, with Br $^-$ 50.0% and with Γ 27.8 %. The other ions assayed (Ag(I) and Hg(I)) eliminate the phosphorescence. As a consequence of these results, no heavy atom

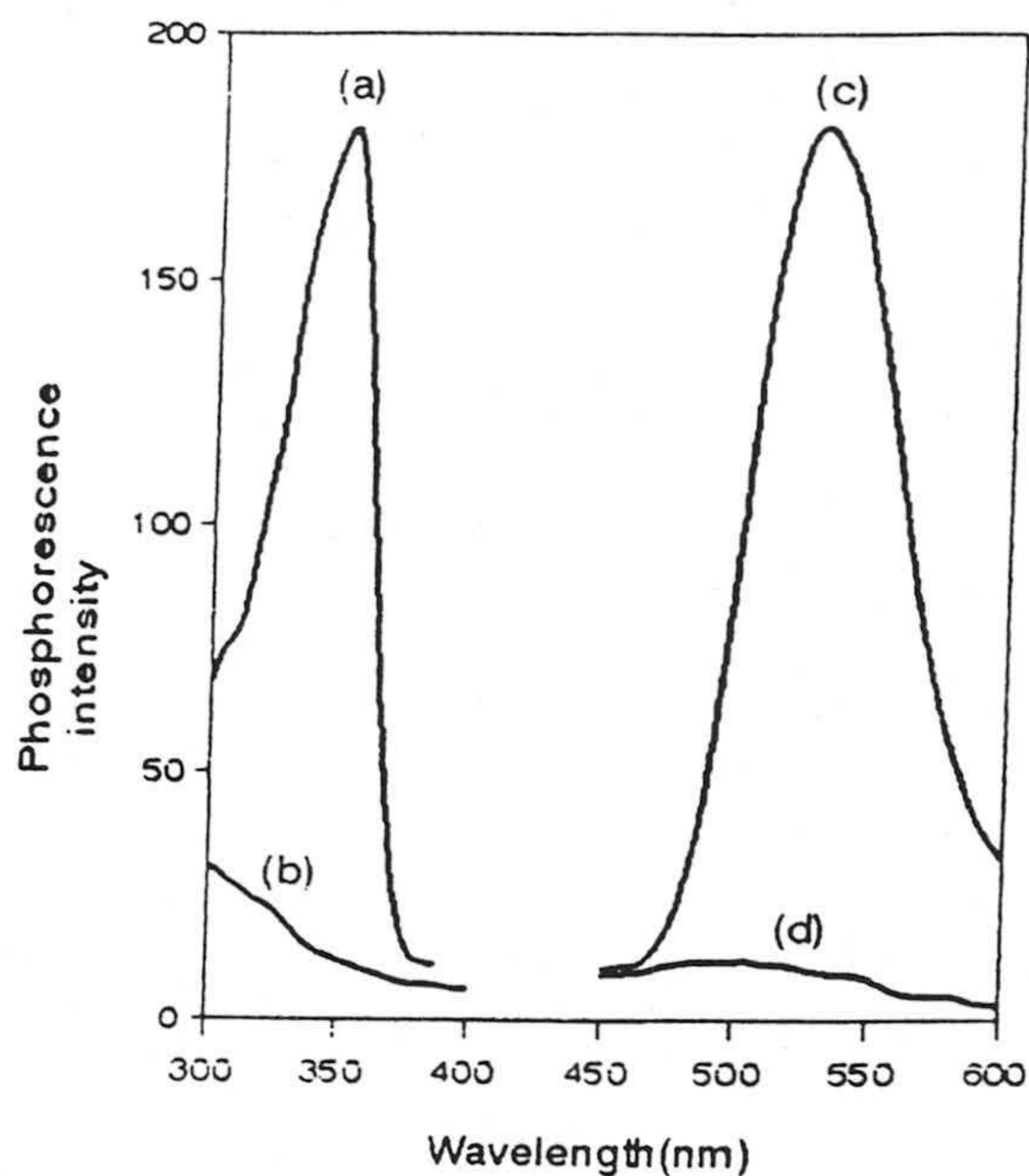


Figure 3. Excitation and emission spectra of : (a) and (b) excitation and emission of the blank; (c) and (d) excitation and emission of the sample of morestan ($1.0 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$).

was used in the next experiments. Secondly, the influence of the kind of paper used as solid support was studied. Three samples and three blanks were prepared with each of the four different kinds of paper (Whatman No. 4 and Albet 235 filter papers, Whatman P-81 cationic and Whatman DE-81 anionic exchanger papers) without pre-treatment. It was found that the Whatman No. 4 paper presents a higher difference between the signal produced by the sample and the blank. The difference in each instance was as follows: 178 for Whatman No 4 filter paper; 86 for Whatman DE-81 anionic exchanger paper; 35 in the case of Whatman P-81 cationic exchanger paper and 1 for Albet 235 filter paper. Whatman No 4 filter paper was therefore selected as the solid support for subsequent experiments.

In order to determine the influence of the delay and gate times on the phosphorescence intensity, t_d was tested between 0.1 and 0.5 ms (maintaining $t_g = 12$

ms) and next, t_g was tested between 4.0 and 13.0 ms maintaining $t_d = 0.15$ ms. The optimum phosphorescence intensity was obtained when $t_d = 0.1$ ms and $t_g = 12.0$ ms. Scan speed did not affect the phosphorescence emission and $240 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$ was used as a working value.

To test the influence of the pH on the phosphorescence, sodium hydroxide and hydrochloric acid solutions at different concentration levels were used. Experimentally it was found that morestan presents constant phosphorescence intensity at pH values ranging between 2.0 and 9.2, decreasing strongly at values lower than 2.0 or higher than 9.2 (Fig. 4). These results are to be expected if we take into account the molecular structure of the morestan and the fact that it does not contain atomic groups with the capacity to attract protons. The influence of the percentage of ethanol was also tested preparing different samples and blanks with percentages of ethanol from 5 to 20%. The relative phosphorescence intensities (RPI), defined as the difference between the intensity emitted for the sample and that emitted for its respective blank, increased when the ethanol percentage increased from 5% to 10%, decreasing quickly for percentages higher than 10%. The need to use 10% of ethanol for the preparation of the sample can be due to the low solubility of morestan in water, which requires a certain amount of ethanol to be present to ensure the total solubilization of the analyte.

As cited in the INTRODUCTION, one of the objectives of this paper is to perform the measurements of phosphorescence intensity without pretreatment of the paper used as a solid support and without an inert gas (N_2) flow, in order to simplify the analytical procedure without noticeably diminishing its analytical quality. To avoid the quenching effect produced by the atmospheric agents, the solid support containing the sample was placed between two quartz plates to measure the analytical signal. To obtain comparative data, we performed the following experiments: the phosphorescence intensities of four samples ($0.6 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ of morestan) and other four blanks were measured, for 30 min, and at timed intervals. As can be seen in Fig 5, four samples, and their respective blanks, were measured

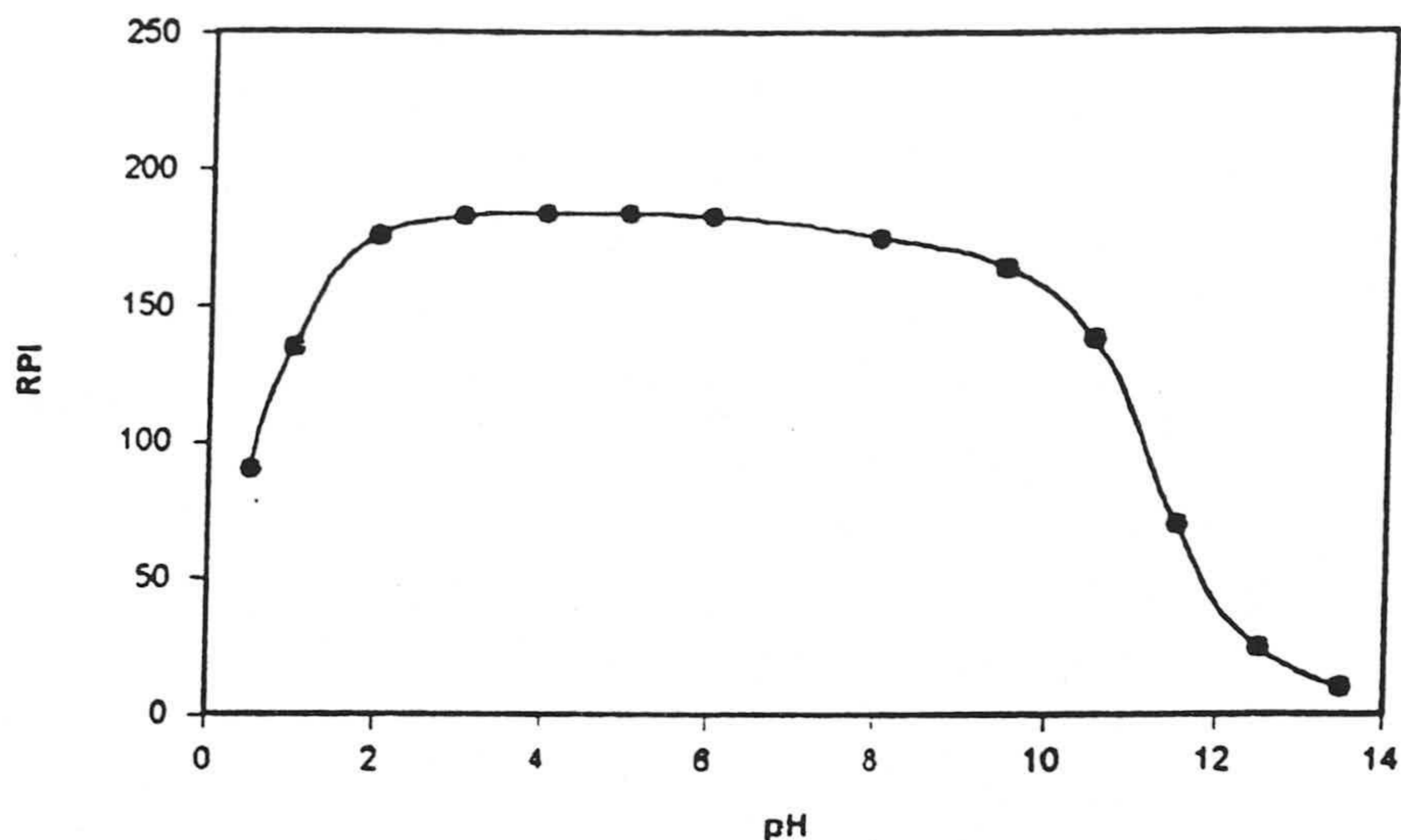


Figure 4. Influence of pH on the phosphorescence intensity of morestan at $0.6 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ concentration level.

with and without dry- N_2 flow and with and without quartz plates. It was found that the RPIs emitted by the samples that were measured with quartz plates were higher than those emitted by the samples without quartz plates. In addition, the RPI emitted by the sample measured with quartz plates and without dry- N_2 flow was higher than the RPI emitted for the sample measured without quartz plates and with N_2 flow. Table 1 includes the values of RPIs emitted by the samples after 1, 3, 5 and 8 minutes after their preparation under the experimental conditions cited. As a consequence we can say that, if the phosphorescence intensity is measured before 6 min after sample preparation and using quartz plates, the flow of N_2 is not necessary. In the next experiments we used 2 min (from the preparation of the sample) as a working time.

Analytical figures of merit

The calibration graph was obtained by means of ten standards (and three replicates of each standard) whose concentration levels ranged between 0.05 and 2.0

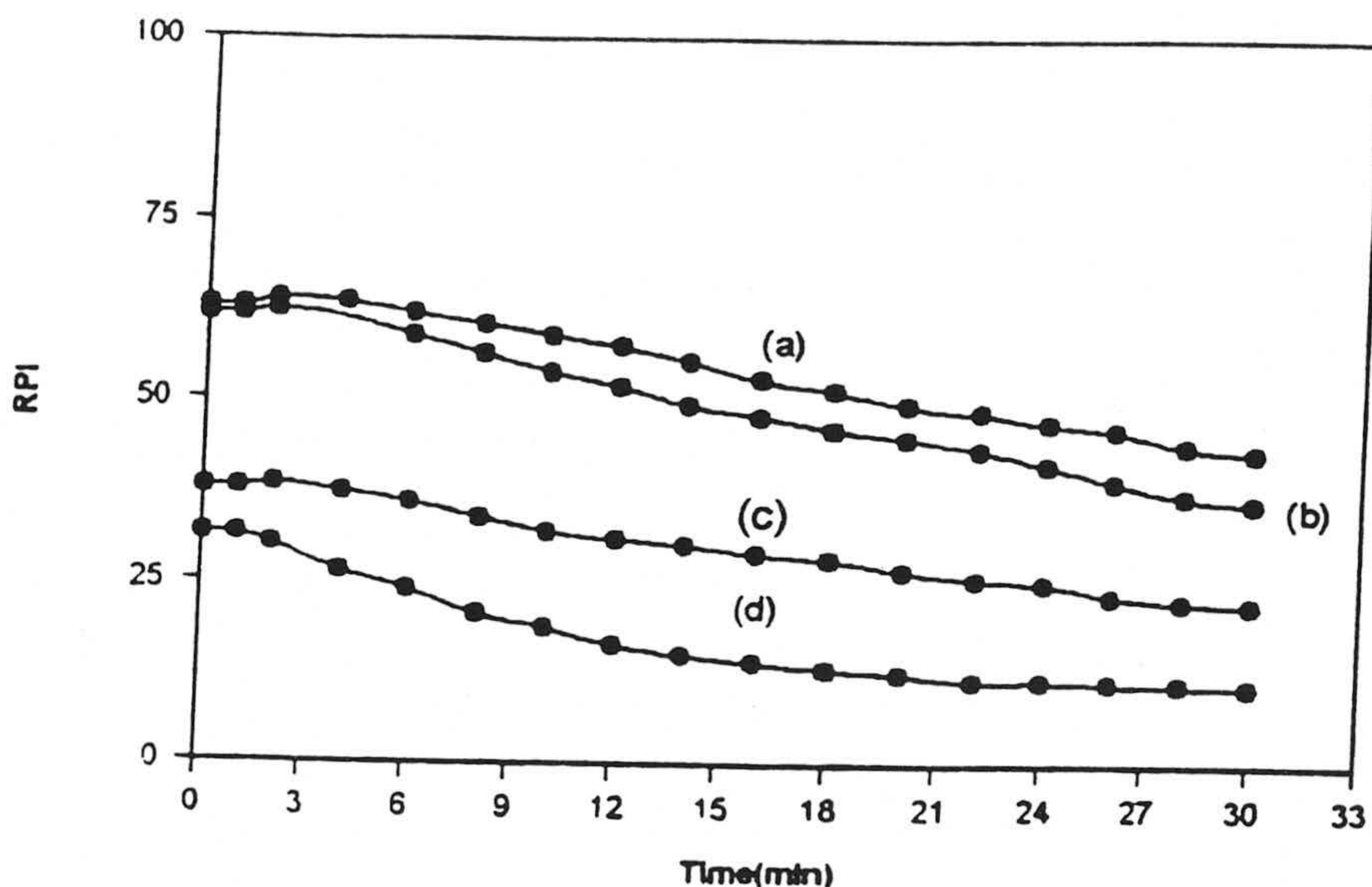


Figure 5. Influence of time on the relative phosphorescence intensity of samples of morestan ($0.6 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$): (a) with N_2 flow and quartz plates; (b) with quartz plates and without N_2 flow; (c) with N_2 flow and without quartz plates; (d) without N_2 flow and without quartz plates.

$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. This calibration graph was found to be linear from 0.1 to $1.0 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ when the *lack-of-fit* test was applied as suggested by the Analytical Methods Committee⁴⁴. The IUPAC detection limit^{45,46} and the quantification limit⁴⁷, determined from a series of ten blanks, were 0.03 and $0.09 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, respectively. As we can see in Table 2, the value of the quantification limit, obtained from standard deviation of the blanks, is near to the value of the lower limit of the linear dynamic range ($0.1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) obtained from the adjustment of the experimental data of the calibration graph, hence this value ($0.1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) being taken as the lower limit of the calibration graph. The repeatability of the method, expressed as relative standard deviation (RSD), was tested from a series of ten samples, whose concentration level in morestan was $0.6 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Table 2 shows these analytical parameters.

TABLE 1

Relative phosphorescence intensity of morestan ($0.6 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) measured at different intervals of time, with and without quartz plates and N_2 flow.

Time ^a	Relative phosphorescence intensity ^b			
	A	B	C	D
1	63	38	62	31
2	64	38	62	30
5	62	37	60	22
8	60	32	56	20
10	58	31	54	18
20	49	27	45	12
30	43	22	36	11

^a Time from the preparation of the sample in minutes.

^b These values are the average of three independent determinations.

A: With nitrogen and quartz plates.

B: With nitrogen and without quartz plates.

C: Without nitrogen and with quartz plates.

D: Without nitrogen and without quartz plates.

TABLE 2

Analytical figures of merit

Intercept	0.706
Slope	94.953
PL(%) ^a	80.7
$L_u - L_i$ ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) ^b	1.0 - 0.1
LDR ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) ^c	0.09
Detection limit ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	0.03
Quantification limit ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	0.09
RSD (%) ^d	1.2

^a Probability level of the lack-of-fit test; ^b L_u and L_i upper and lower limits of the calibration graph; ^c Linear dynamic range; ^d Relative standard deviation from ten samples $0.6 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ of morestan.

Interferences

In order to test the selectivity of the method, the species that potentially could produce interferences were checked at a concentration level of $100.0 \mu\text{g.l}^{-1}$. If interference occurred, the concentration was reduced until the foreign species produced an error lower than $\pm 5.0\%$ in the determination of the analyte. The maximum concentration of foreign species producing an error $\leq 5.0\%$ was the tolerance level. The tolerance levels of the different species assayed are included in the Table 3. As we can see in this table, other pesticides that usually produce interferences in the determination of morestan, do not produce interferences when this method is used, which probably could be due to the absence of the heavy ions that are usually needed as enhancers of the phosphorescence intensity of the other phosphors.

Applications

To extract the pesticide from the real samples (mainly when the samples were vegetables) ethanol, dichloromethane, acetone, ethyl acetate and acetonitrile were checked as solvents. In all cases the extraction process was performed as described in the section Procedure for vegetable samples. The best results were obtained when acetonitrile was used as solvent. In this case the percentages of recovery ranged between 93% and 104%, whereas about 50% was the level of recovery in the case of ethanol, dichloromethane and acetone and about 75% using ethyl acetate.

In order to test the applicability of the method in real samples, several vegetables (cucumber, potato and green bean), in whose cultivation morestan is used, and different types of water (tap, natural, sea and river waters), were tested. All samples analyzed, fortunately, were free of morestan, or contained a concentration lower than the detection limit of our method. Therefore, to check the accuracy of the proposed methods a recovery study was carried out with samples previously contaminated by the addition of a known amount of morestan. For this, precisely weighed amounts of chopped vegetables (approximately 50 g) were mixed

TABLE 3

Effects of foreign ions or pesticides on the determination of morestan ($0.6 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)

Species or ions	Tolerance level ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)
Captan, Benomyl, Folpet, Warfarin,	50.0
Lindane, Humic Acid.	
Carbaryl,	30.0
Thiabendazole	25.0
Dichlone	15.0
Cl^- , Cu(II)	100.0
SO_4^{2-} , PO_4^{3-} , NO_3^- , Br^- , F^- , Al(III) , Fe(III) ,	50.0
Ca(II) , Mg(II) , CO_3^{2-}	25.0
Be(II)	7.0

TABLE 4

Recovery study of morestan in foodstuffs using acetonitrile as solvent

Matrix	Added ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	Found ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	Recovery (%)	
Cucumber	1.00	0.93	93.0	
	1.00	0.95	95.0	
	1.00	1.01	101.0	
	0.50	0.50	100.0	
	0.50	0.49	98.0	
	0.50	0.47	94.0	
	0.25	0.23	92.0	
	0.25	0.25	100.0	
	0.25	0.26	104.0	
	Green bean	1.00	0.97	97.0
		1.00	0.95	95.0
		1.00	0.96	96.0
0.50		0.48	96.0	
0.50		0.52	104.0	
0.50		0.49	98.0	
0.25		0.24	96.0	
0.25		0.26	104.0	
0.25		0.25	100.0	
Potato		1.00	0.91	91.0
		1.00	0.94	94.0
		1.00	0.87	87.0
	0.50	0.51	102.0	
	0.50	0.48	96.0	
	0.50	0.49	98.0	
	0.25	0.25	100.0	
	0.25	0.24	96.0	
	0.25	0.25	100.0	

TABLE 5
Recovery study of morestan in different types of waters

Matrix	Added ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	Found ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	Recovery (%)	
Mineral water (Lanjarón Granada)	0.80	0.81	101.2	
	0.80	0.79	98.7	
	0.80	0.78	97.5	
	0.60	0.58	96.7	
	0.60	0.63	105.0	
	0.60	0.61	101.7	
	0.40	0.41	102.5	
	0.40	0.40	100.0	
	0.40	0.38	95.0	
	Mineral water (Fontdor Gerona)	0.80	0.83	103.8
		0.80	0.81	101.3
		0.80	0.79	98.7
0.60		0.59	98.3	
0.60		0.62	103.5	
0.60		0.57	95.0	
0.40		0.39	97.0	
0.40		0.41	102.5	
0.40		0.40	100.0	
Mineral water (FontVella Gerona)	0.80	0.82	102.5	
	0.80	0.78	97.5	
	0.80	0.81	101.2	
	0.60	0.60	100.0	
	0.60	0.62	103.3	
	0.60	0.58	96.7	
	0.40	0.41	102.5	
	0.40	0.39	97.5	
	0.40	0.40	100.0	
Tap water (Granada city)	0.80	0.78	97.5	
	0.80	0.81	101.3	
	0.80	0.82	102.5	
	0.60	0.64	106.7	
	0.60	0.60	100.0	
	0.60	0.59	98.3	

(continued)

(TABLE 5, continued)

Matrix	Added ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	Found ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	Recovery (%)
	0.40	0.39	97.5
	0.40	0.40	100.0
	0.40	0.41	102.5
Sea water	0.80	0.78	97.5
(Motril-Granada)	0.80	0.84	105.0
	0.80	0.81	101.5
	0.60	0.61	101.7
	0.60	0.59	98.3
	0.60	0.61	101.7
	0.40	0.42	105.0
	0.40	0.40	100.0
	0.40	0.38	95.0

with the appropriated volumes of morestan standard solution of known concentration. After 24 hours the pieces of vegetable were separated from the solution and dried, at room conditions, to constant weight. Aliquots of these samples were taken for analysis using the methodology described above in the section *Procedure*. Table 4 summarizes the results obtained.

In the case of water samples the analysis was performed after 24 hours after the addition of the appropriate volume of standard containing morestan. The results obtained are summarized in Table 5.

CONCLUSIONS

Morestan can be determined in vegetables and waters by solid phase room temperature phosphorescence using this simple, inexpensive, and quick method. In the worst case (vegetables that need extraction) the time required for the analysis is

TABLE 6

Methods for the determination of morestan in different matrices

Technique	Detection	Matrix	DL ^A ($\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)	Reference
Gc ^a	MD ^b	Drinking waters	0.5	48
GC	MD	Fruits, vegetables	1.0	49
GC	NPD ^c	Rice	10.0	50
GC	-----	Polished rice	10.0	51
GC	ECD ^d	Apple, pear, cucumber	300.0	52
GC	ITMS ^e	-----	-----	53
HPLC ^f	PFL ^g	Brown rice	10.0	54
HPLC	MD	Fruits, vegetables	-----	55
HPTLC ^h	AMD ⁱ	Drinking waters	0.1	56
MLC ^j	EFP ^k	-----	0.2 or 5.0*	57
GPC ^l	-----	Fruits, vegetables	-----	58
SGC ^m	FL ⁿ	Waters	0.01**	32
CGC ^p	AE ^q	Foodstuffs	10.0	59
CGC	MD	Vegetables	-----	60
SF ^r	FL	Fruits, vegetables	50.0	31
SPS ^s	FL	Waters	0.15	41
This method	PH ^t	Waters, vegetables	30.0	-----

A) Detection limit; ^a) Gas chromatography; ^b) Mass detector; ^c) Nitrogen phosphorous detection; ^d) Electron capture detection; ^e) Ion-trap mass spectrometry; ^f) High performance liquid chromatography; ^g) Photolysis-fluorescence detection; ^h) High performance thin layer chromatography; ⁱ) Automated multiple development; ^j) Micro liquid chromatography; ^k) Electro spray photometric; ^l) Gel permeation chromatography; ^m) Silica gel chromatography; ⁿ) Fluorescence; ^p) Capillary gas chromatography; ^q) Atomic emission; ^r) Spectrofluorimetry; ^s) Solid phase spectrofluorimetry; ^t) Phosphorescence. *) 0.2 μg by emission of S and 5.0 ng by emission of P. **) 0.01 μg .

about 20 min for the extraction process and 5 min for the preparation of the sample and measurement of the analytical signal. In the case of water samples only 5 min are needed. The reagents and the paper used as solid supports are available and inexpensive and the instrumentation necessary is conventional. Moreover, the use of quartz plates for carrying out the measurements of phosphorescence intensity, diminish the price of the analysis (the dry-N₂ is not needed), without decreasing the analytical quality of the method.

In order to compare the proposed method with other recorded methods for the determination of morestan, we have included the more notable analytical characteristics of the latter in Table 6. As can be seen, the accuracy, precision and sensitivity of our method are acceptable, and the detection limit permits the analysis of morestan at trace levels in different matrices. However, the authors are conscious for the need of new studies that probe the utility of the quartz plates in other cases with different analytes.

REFERENCES

1. T. VO-DINH, *Room-Temperature Phosphorimetry for Chemical Analysis*; Willey Intercience; New York (1984).
2. R.J. HURTUBISE, *Phosphorimetry: Theory, Instrumentation and Applications*; VC Publishers, Inc.; New York, (1990).
3. W. WATTS, A. PAL, L. FORD, G.H. MILLER, T. VO-DINH, D. EASTWOOD and R. LIDBERG, *Appl. Spectrosc.*, **46**, 1235 (1992).
4. I.M. WARNER, and L.B. MCGOWN, *Anal. Chem.*, **60**, 162R (1988).
5. L.B. MCGOWN and I.M. WARNER, *Anal. Chem.*, **62**, 255R (1990).
6. I.M. WARNER and L.B. MCGOWN, *Anal. Chem.*, **64**, 343R (1992).
7. S.A. SOPER, L.B. MCGOWN and I.M. WARNER, *Anal. Chem.* **66**, 428R (1994).
8. JIN WEIJUN and LIU CHANGSONG, *Anal. Chem.* **65**, 863 (1993).

9. A.M. ALAK, N. COTOLINI and T. VO-DINH, *Anal. Chim. Acta*, 217, 171 (1989).
10. T. VO-DINH and A.M. ALAK, *Appl. Spectrosc.*, 41, 963 (1987).
11. A. PAL, A. W. WATTS, J. CARAWAY and T. VO-DINH, *Analisis*, 20, 149 (1992).
12. J.J. AARON, A.D. CAMPIGLIA and J.D. WINEFORDNER, *Anal. Chim. Acta*, 236, 257 (1990).
13. C.G. DE LIMA, M.M. ANDINO and J.D. WINEFORDNER,
14. A.M. ALAK and T. VO-DINH, *Anal. Chem.* 60, 596 (1988).
15. A.D. CAMPIGLIA and C.G. DE LIMA, *Anal. Chem.*, 59, 2822 (1987).
16. J.J. VANNELLI and E.M. SCHULMAN, *Anal. Chem.*, 56, 1030 (1984).
17. S. YANG SU, A.A. EBENEZER and S. OCAK, *Analyst*, 109, 1019 (1985).
18. R.Q. AUCÉLIO and A.D. CAMPIGLIA, *Anal. Chim. Acta*, 309, 345 (1995).
19. T. VO-DINH, E. LUE YEN and J.D. WINEFORDNER, *Anal. Chem.*, 48, 1186 (1976).
20. M.C. GARCÍA ALVAREZ-COQUE, G. RAMIS RAMOS, A.M. O'REILLY and J.D. WINEFORDNER, *Anal. Chim. Acta*, 204, 247 (1988).
21. M.E. DÍAZ-GARCÍA and A. SANZ-MEDEL, *Anal. Chem.*, 58, 1436 (1986).
22. W.J. JIN and C.S. LIU, *Microchem. J.*, 48, 94 (1993).
23. C. CRUCES-BLANCO, A. SEGURA-CARRETERO and A. FERNÁNDEZ-GUTIERREZ, *Anal. Chim. Acta*, 318, 357 (1996).
24. J. WEI-JUN, W. YAN-SHENG, D. WEN-SHENG, L. CHANG-SONG, Z. SU-SHE, *Anal. Chim. Acta*, 287, 95 (1994).
25. L.J. CLINE LOVE, M. SKRILEC and J.G. HABARTA, *Anal. Chem.*, 52, 754 (1980).
26. S. SCYPINSKI and L.J. CLINE LOVE, *Anal. Chem.* 56, 322. (1984).
27. R.A. FEMIA and L.J. CLINE LOVE. *Anal. Chem.*, 56, 327. (1984).
28. YAN SHENG WEI, WEI-JUN JIN, RUO-HUA ZHU, CIUO-WEN XING, CHANG-SONG LIU, SHU-SE ZHANG and SHU-SE ZHANG, *Spectrochim. Acta*, Part A, 52 (1996).

29. R.T. PARKER, R.S. FREEDLANDER and R.B. DUNLAP, *Anal. Chim. Acta*, 120, 1 (1980).
30. S.W. TJIOE and R.J. HURTUBISE, *Talanta*, 42, 971 (1995).
31. Y. FRANCOUER and V. MALLET, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 59, 172 (1976).
32. V. MALLET, C. LEBEL, and D.P. SURETTE, *Analisis*, 9, 643 (1974).
33. F.E. HEARTH, D.E. OTTO and G.A. GUNTHER *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 49, 774 (1966).
34. R. BRENNECKE and K. VOGELER, *Pflanzenschutz-Nachr.*, 37, 46 (1984).
35. J.L. BERNAL, M.J. DEL NOGAL, J. ATIENZA and J.J. JIMÉNEZ, *Chromatographia* 33, 67 (1992).
36. R. HAVES, J.M. ADAMS and C.A. ANDERSON, *J. Agric. Food Chem.*, 12, 247 (1964).
37. H. TIETZ, M. OSMON, H. FREHSE and H. NIESSEN, *Pflanzenschutz-Nachr. Bayer*, 15, 170 (1967).
38. H. VOGLER and H. NIESSEN, *Pflanzenschutz-Nachr. Bayer*, 20, 550 (1967).
39. C.A. ANDERSON, *Analytical Methods for Pesticides, Plant Growth Regulator and Food Additives*, vol. 5, Academic Press, New York, G. Zweig (editor).
40. G.H. TJAN and T. KONTER, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 54, 1122 (1971).
41. J.L. VÍLCHEZ, R. AVIDAD, J ROHAND, A. NAVALÓN and L.F. CAPITÁN-VALLVEY, *Anal. Chim. Acta*, 282, 445 (1993).
42. Statgraphics V 6.0 Manugistics Inc and Statistical Graphics Corporation, USA, (1992).
43. APHA-AWWA-WPCF, *Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales*. Ed. Díaz de Santos S.A. Madrid (1992).
44. ANALYTICAL METHODS COMMITTEE, *Analyst*, 119, 2363 (1994).
45. NOMENCLATURE, SYMBOLS, UNITS AND THEIR USAGE IN SPECTROCHE-MICAL ANALYSIS, *Spectrochim Acta (B)*, 33B, 242 (1978).

46. ANALYTICAL METHODS COMMITTEE, *Analyst*, 113, 1469 (1988).
47. GUIDELINES FOR DATA ACQUISITION, *Anal. Chem.*, 52, 2242 (1980).
48. M. AAKERBLOM, L. THOREN and A. STAFFAS, *Vaar Foeda*, 42, 236 (1990).
49. M. OKIHASHI, H. OBANE, S. HORI and T. NISHIMUNE *Shokuin Eiseiyaku Zasshi*, 35(3), 258 (1994).
50. T. ITOYAMA, Y. SEKIGUCHI, S. KIOGUCHI, Y. HIRAHARA, M. OHTA, M. KIMURA, T. MIYOSHI, N. TOMOTO NARITA, et. el. *Shokuin Eiseiyaku Zasshi*, 36(4), 516 (1995).
51. Y. HIRAHAWA, M. NARITA, K. OKAMOTO, T. MIYOSHI, M. MIYATA, S. KOIGUCHI, Y HASEGAWA *Shokuin Eiseiyaku Zasshi*, 35(5), 517 (1994).
52. R. A. BAUMAN, G.F. ERNST, J.T.A. JANSEN, A DE KOK, P.D.A. OLTHOF, L.G.M.T. TUINSTRA, W. VERNAL, P. VAN ZONEN and F. HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 339, 357 (1991).
53. T. CAIRNS, K.S. CHIU, D. NAVARRO and E. SIGMUND, *Rapid Commun. Mass Spectrum*. 7(11), 971 (1993).
54. N. TAKEDA, M. TSUJI and Y. AKIYAMA *Shokuin Eiseigaku Zasshi*, 36, 601 (1995).
55. L. DAGNA, G. GASPARINI, M.L. ICARDI and E. SESIA, *Boll. Chim. Ig. Pante Sci.* 44, 383 (1993).
56. S. BUTZ and H.J. STAN, *Anal. Chem.*, 67(3), 620 (1995).
57. S. OKAZAKI and Y. SUZUKI, *Nippon Kagaku Kaishi*, 1, 38 (1990).
58. G. FUCHSBICHLER, *Landwirtsch. Forsch.*, 36, 1.(1983).
59. H. J. STAN and M. LINKERHAENER, *J. Chromatogr.*, A, 750 (1996).
60. M. TAKINO and S. YAMASHITA, *Int. Symp. Chromatogr. 35th Anniv. Res. Group Liquid Chromatogr. Jpn.* 503, 16 (1995).

Received: April 21, 1998

Accepted: July 22, 1998

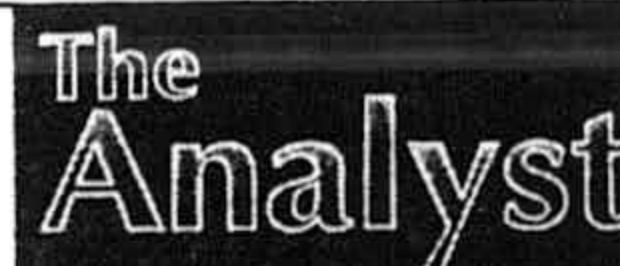
APÉNDICE N° 5

Titulo: Application of partial least squares multivariate calibration for the determination of mixture of carbaril and thiabendazole in Water by Solid-Phase especrophosphorimetry.

Autores: L. F. Capitán-Vallvey, Mahmoud. Kalil A. Deheidel, I. De Orbe and R Avidad.

Revista: Analyst, 124, 49-53 (1999).

Application of partial least squares multivariate calibration for the determination of mixtures of carbaryl and thiabendazole in waters by transmitted solid phase spectrophosphorimetry



L. F. Capitán-Vallvey, Mahmoud Kalil A. Deheid, I. de Orbe and R. Avidad*

Department of Analytical Chemistry, University of Granada, Granada 18071, Spain.
E-mail: lcapitan@goliat.ugr.es

Received 7th October 1998, Accepted 5th November 1998

Mixtures of the pesticides carbaryl and thiabendazole were studied using solid phase spectrophosphorimetry at room temperature with Whatman No. 4 filter-paper as solid support and Pb(II) as enhancer of the phosphorescence. The transmitted phosphorescence was used as an analytical signal and its measurement was performed by placing the paper containing the sample between two quartz plates. In this way, the use of a dry inert gas flow to avoid the quenching of atmospheric agents (oxygen and moisture) is not needed. The influence of several experimental parameters (*e.g.*, pH, nature of the enhancers and solid supports, gate and delay times) on the phosphorescent emission of both chemicals was also studied. As a result, a new method for the simultaneous determination of these pesticides is proposed, using partial least squares (PLS-1) multivariate calibration. The statistical parameters of the optimised matrix, are included as a table. The applicable concentration ranges were from 0.16 to 1.20 mg l⁻¹ for thiabendazole and from 0.50 to 4.00 mg l⁻¹ for carbaryl. The method was applied to the determination of both pesticides in water, with recoveries between 93.4 and 105.6% for carbaryl and between 90.0 and 105.0% for thiabendazole. HPLC was used as a reference method.

Introduction

One of the current requirements in analytical chemistry is to detect and quantify smaller amounts of chemical contaminants in samples of diverse natures, with low cost and time consumption. Hence selective, sensitive, rapid and inexpensive methods of analysis, using readily available, conventional instrumentation, must be developed. Room temperature phosphorimetry is a technique that allows the development of analytical methods that combine these qualities because, together with the natural sensitivity and selectivity of luminescent methods, it can reduce costs through the use of inexpensive materials and reagents, and provides short analysis times. The methodology employed in room temperature phosphorescence (RTP) is based on the measurement of the phosphorescence intensity in a solid phase,¹⁻⁵ or in solution if the analyte forms an inclusion complex (cyclodextrins),^{6,7} or micellar-stabilised media with non-polar molecules containing a polar group.⁸⁻¹⁰ Obviously, the use of paper as a solid support diminishes the cost of the analysis, but it has the disadvantage of showing a background signal produced by the substrate, which can limit its application in the detection of trace analytes. There are several ways to diminish the background signal of the paper used as a solid support, the best known being chemical pre-treatment, irradiation with ultraviolet light or extraction with water in a Soxhlet apparatus.¹¹⁻¹⁵ With these treatments of the paper used as support, the background signal can be 6% of its initial value, but the time of analysis increases and the precision of the measurements can decrease.

Additionally, a factor influencing strongly the phosphorescence of the sample and decreasing the intensity of the emitted signal, both in solution and in the solid phase, is the quenching effect produced by environmental moisture and oxygen. This effect has been avoided in the past by the addition of sulfite, in the case of measurements in solution,¹⁶ or by using a flow of a dry, inert gas (usually N₂ or He) in the compartment of the spectrometer when the measurement is performed in the solid

phase.¹⁷ However, it is clear that the use of a flow of inert gas and/or pre-treatment of the solid support to avoid background signals increases the time and cost of the analysis.

With the aim of improving the experimental procedures, using paper as a solid support, we studied the phosphorescent behaviour of phosphors, modifying the experimental procedure that is usually used in phosphorimetry. This modification consists of the measurement of the diffuse transmitted phosphorescence emitted from the analyte, placing the paper containing the sample between two quartz plates. In this way, a flow of inert gas and pre-treatment of the paper used as a solid support are not needed and the analysis is consequently faster.

A second objective was to test the suitability of multivariate calibration methods for the determination of mixtures of analytes in the solid phase whose phosphorescence spectra overlap substantially. The phosphors studied here were two pesticides widely used in agriculture, carbaryl (CBL) and thiabendazole (TBZ). The former has been described as a phosphorescent chemical,^{1,2,9,15,18} but we did not find any references to the phosphorescence emission of TBZ. These chemicals show similar spectra, and to resolve the considerable spectral overlap we used the partial least squares (PLS) multivariate calibration method, developed and applied by Wold *et al.*¹⁹⁻²¹ The main advantages of this statistical method are the speed of the handling of results and the determination of the analytes without previous separation. PLS methods have been used in several studies for the determination of different analytes (*e.g.*, pesticides, sulfonamides and flavour enhancers)²²⁻²⁹ in solution, although the main application of the PLS methods has been for calibration in near-infrared and nuclear magnetic resonance spectroscopy in the solid phase.³⁰ In this work, in addition to the study mentioned above of the phosphorescent behaviour of CBL and TBZ, we applied the PLS method in solid phase spectrophosphorimetry to test its suitability for this methodology. As a result of this study, a new method for the determination of CBL and TBZ in mixtures is proposed. The method combines the advantages of solid phase

spectrophosphorimetry (selectivity and sensitivity) and of multivariate calibration (speed and no previous separation of components). It is also inexpensive, because only common reagents and materials and conventional instrumentation are needed.

Experimental

Apparatus

The measurements of phosphorescence were performed with a Perkin-Elmer (Norwalk, CT, USA) LS-50 luminescence spectrometer, working in the phosphorescence mode, and equipped with a Hamamatsu R289 photomultiplier, two Monk-Gillieson F/3 monochromators and a xenon discharge lamp (with a power equivalent to 20 kW during 8 μ s), and interfaced to a PS/230-386 microcomputer. The spectrometer was checked daily using a P1 standard (12.5 \times 12.5 \times 45 mm) containing europium(III) thenoyltrifluoroacetate dissolved in a transparent matrix of poly(methyl methacrylate), supplied by Perkin-Elmer. Other apparatus and laboratory materials were a Crison (Barcelona, Spain) digital pH meter with a combined glass-saturated calomel electrode, a micropipette Biohit Proline (Helsinki, Finland) micropipette 10 μ l, a Selecta (Barcelona, Spain) ultrasonic bath, a Braun Silencio 1600 hair-dryer (maximum power 2000 W) and a 250 W infrared heat lamp. Two rectangular (45 \times 12 \times 1 mm) Hellma Suprasil (Müllheim, Baden, Germany) quartz plates were also used to perform the measurements of the transmitted RTP. Software programs used for the treatment of the spectral data were Grams/286 Software Package Version 1.0, Add Application PLS Plus Version 2.1 (Galactic Industries, Salem, MA, USA) and Data Leader Software Package (Beckman, Fullerton, CA, USA; 1987).

Reagents

Stock standard solutions of TBZ (Dr. Ehrenstorfer, Ausburg, Germany) and CBL (Riedel-de Haën, Hannover, Germany) were prepared in ethanol at a concentration of 100.0 mg l⁻¹. Working standard solutions were prepared by appropriate dilution with reverse osmosis quality water (obtained using a Milli-Ro 12 plus Milli-Q Station from Millipore, Bedford, MA, USA). Stock standard solutions of saturated Pb(II), 1 M Tl(I), 1 M Ag(I) and 1 M KI were prepared from lead acetate, AgNO₃, TlNO₃ and KI solid salts (Merck, Darmstadt, Germany), respectively. A buffer solution of the required pH (4.0) was prepared from 1 M sodium acetate and 1 M acetic acid solutions (Merck). All reagents were of analytical reagent grade unless stated otherwise.

Phosphorescence measurements

Diffuse transmitted phosphorescence spectra were recorded between 400 and 570 nm, the plane of the sample forming two angles of 45° with the excitation and emission beams (Fig. 1).³¹ These spectra were obtained with a delay time $t_d = 0.1$ ms and a gate time $t_g = 12$ ms. The excitation and emission slits were 2.5 and 5.0 nm, respectively, and the scan speed was 240 nm min⁻¹. The solid support containing the sample was placed in the holder of the spectrometer shown in Fig. 1.

Procedure

On a 50 \times 12 mm strip of Whatman (Maidstone, Kent, UK) No. 4 filter-paper soaked in acetic acid-sodium acetate buffer

solution (pH 4.0) and then dried, 3 μ l of saturated Pb(CH₃COO)₂ solution and 3 μ l of sample solution containing between 0.5 and 3.6 ng of TBZ and between 1.5 and 12.0 ng of CBL were spotted with the aid of a micropipette. The paper containing the reagents was dried for 3 min by means of a hot air stream from the hair-dryer placed 7 cm above the sample at 600 W power. Next, the solid support with the sample was placed between the quartz plates and the assembly was inserted in the sample compartment of the instrument. The phosphorescence spectra were obtained as described in the previous section.

Results and discussion

Spectral characteristics

CBL and TBZ in the solid phase gave the emission spectra shown in Fig. 2. It can be seen that the spectra of both analytes

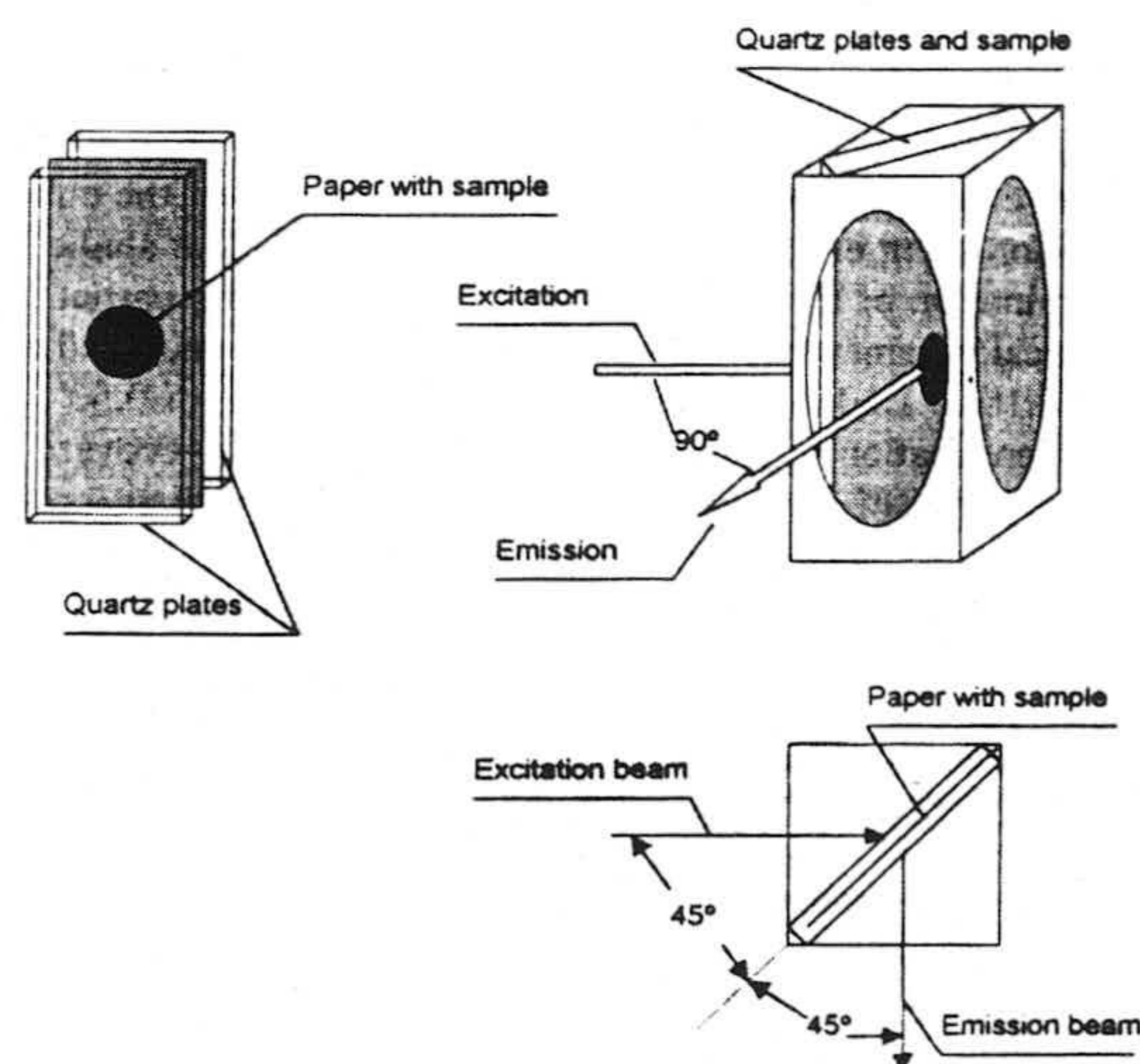


Fig. 1 Placing of the sample and quartz plates in the holder of the spectrometer.

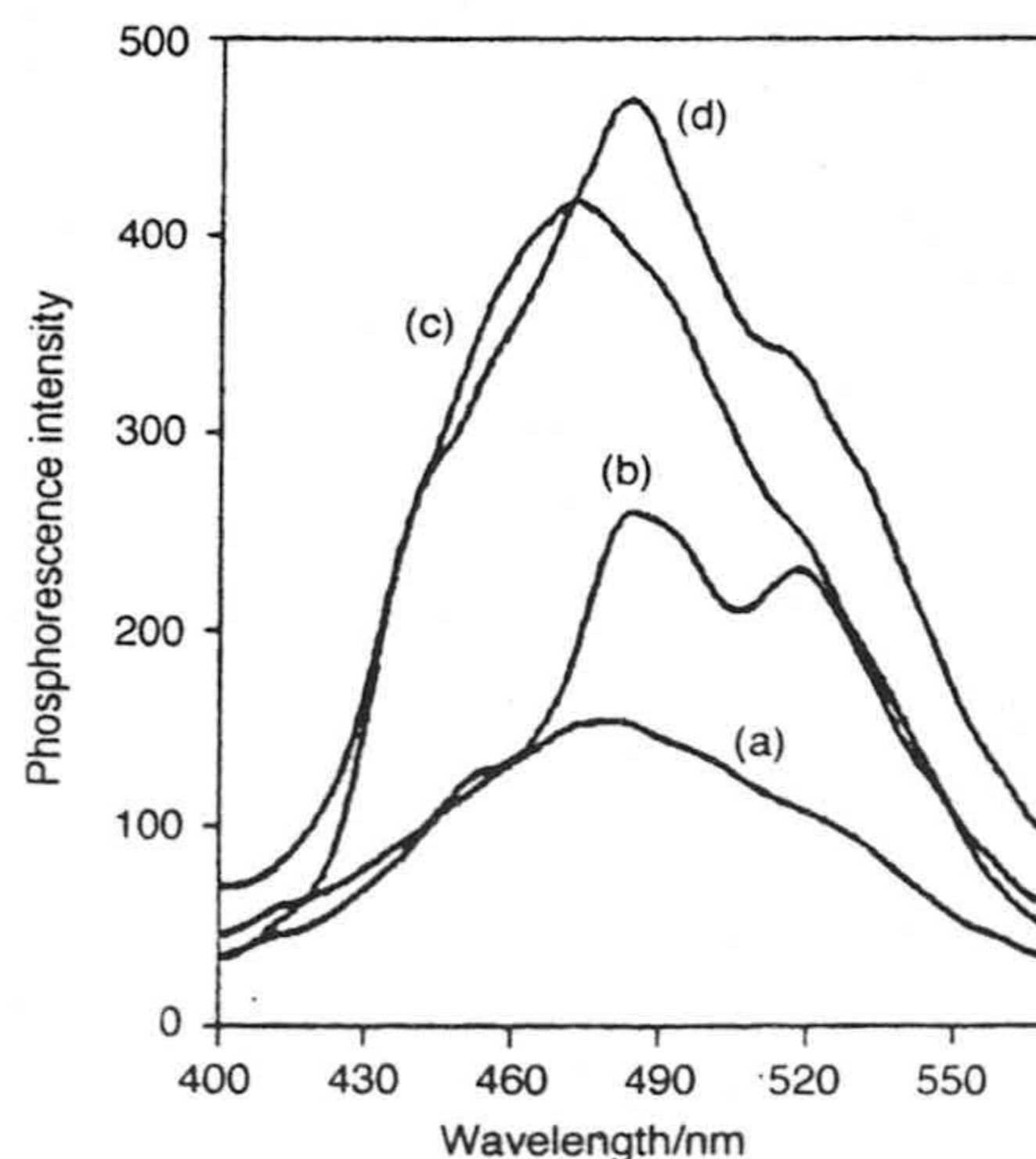


Fig. 2 Phosphorescence spectra of TBZ and CBL fixed in Whatman No. 4 filter-paper. (a) Blank; (b) CBL at 3.8 μ g ml⁻¹; (c) TBZ at 1.0 μ g ml⁻¹; (d) CBL (2.8 μ g ml⁻¹) and TBZ (0.8 μ g ml⁻¹) mixed.

overlap greatly and they are clearly different from the blank spectrum. The peak wavelength in the emission spectrum of the TBZ is 472 nm ($\lambda_{ex} = 303$ nm) and for CBL there are two peaks in the emission spectrum at 486 and 520 nm ($\lambda_{ex} = 282$ nm). This overlap hinders the simultaneous determination of the two chemicals by conventional spectrophosphorimetric methods, but the problem can be resolved by using multivariate calibration after the optimisation of the experimental parameters that influence the phosphorescence intensity emitted by the phosphors. The experimental parameters, individually optimised for each pesticide, were as follows: pH, volume of analyte, nature and volumes of buffer and heavy ion solutions, delay and gate times, nature of the solid support and drying time of the sample.

Whatman No. 4 and Albet No. 1305 filter-papers and Whatman P-81 and Whatman DE-81 ionic exchange papers were checked as solid supports. It was found that the greatest difference between the signals produced by the sample and the respective blank were obtained when Whatman No. 4 filter-paper was used as the solid support. Next, in order to minimize the background signal produced by the solid support, several strips of Whatman No. 4 paper were subjected to extraction with reverse osmosis quality water in a Soxhlet column for 24 h, after which they were dried and irradiated with ultraviolet light for 12 h. The blanks prepared with these pre-treated supports presented a background signal three times lower than the blanks prepared with the paper without pre-treatment; however, the net phosphorescence intensity (sample signal - blank signal) obtained by using pre-treated papers was around 14% lower with papers without pre-treatment. As a consequence, Whatman No. 4 filter-paper without pre-treatment was used as the solid support in subsequent experiments, giving a better analytical signal than with pre-treated paper, and in a shorter time.

Second, the influence of the heavy ion usually used as an enhancer of phosphorescence intensity was tested, using Pb(II) as the acetate salt, Tl(I) and Ag(I) as the nitrate salts and KI at different concentration levels. The best net phosphorescence intensity was obtained using saturated Pb(II) solution as the enhancer for TBZ and 1 M Tl(I) or saturated Pb(II) solution for CBL. As a consequence, Pb(II) was selected as the enhancer of phosphorescence intensity for both analytes. Next, different volumes of saturated Pb(II) solution, ranging between 1.0 and 5.0 μl , were tested in order to find the optimum volume. It was found that 3.0 μl produced the best net phosphorescence intensity (NPI).

Hydrochloric acid and sodium hydroxide solutions of different concentrations were used to test the influence of pH on the phosphorescence emitted by the analytes. As can be seen in Fig. 3, the phosphorescence intensity emitted by CBL remains constant at pH values between 2.0 and 8.0, decreasing rapidly at lower or higher pH values. The decrease at pH > 8.0 is due to the hydrolysis of CBL, producing the derivative 1-naphthol,

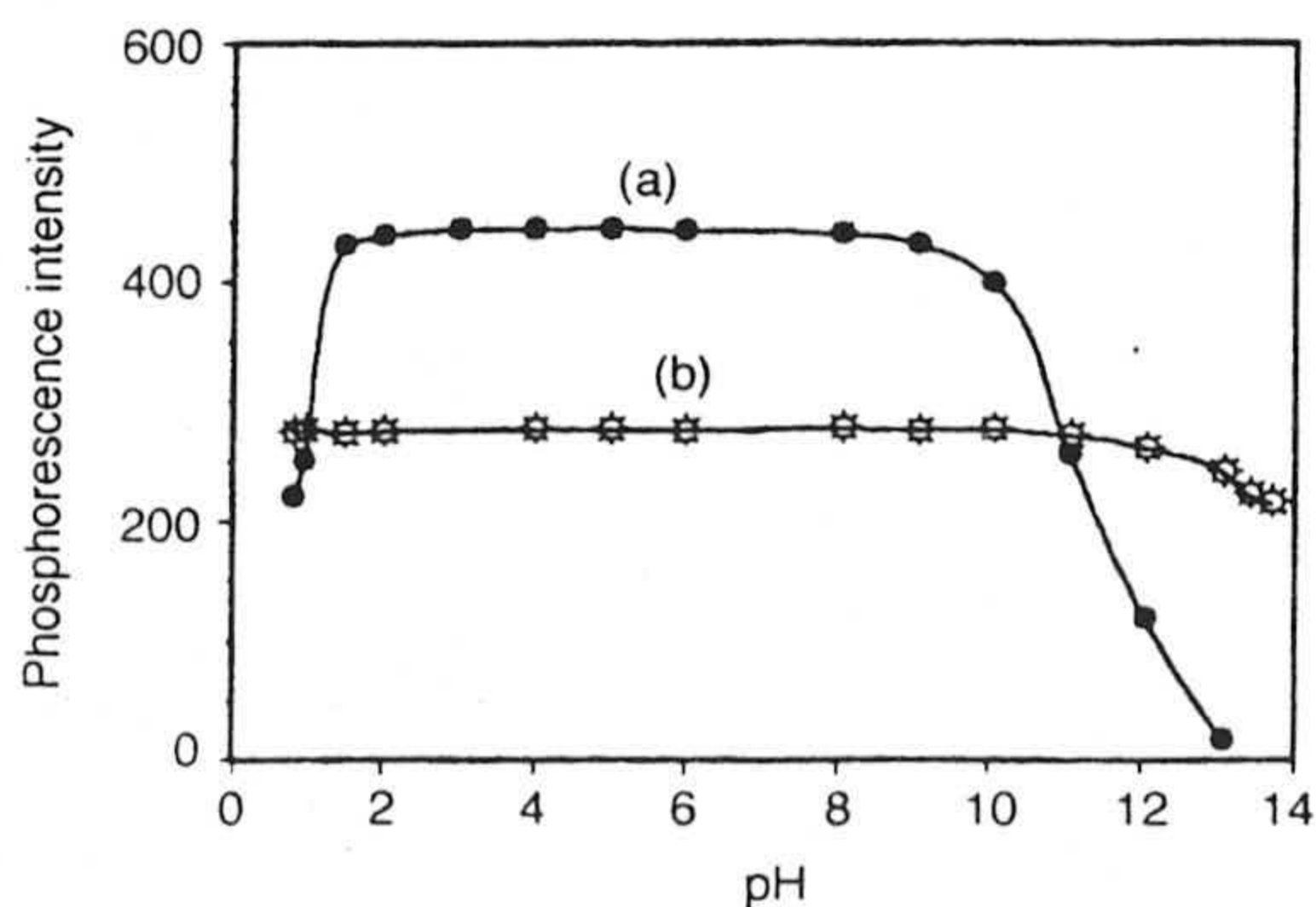


Fig. 3 Influence of pH on the phosphorescence intensities of (a) CBL and (b) TBZ.

which does not show phosphorescence under the present experimental conditions. For TBZ, pH has no influence on the phosphorescence intensity in the range 1.0–10.0, and only in a very basic medium (pH \geq 12.0) is a decrease noticeable. As a consequence of these results, although the pH did not appreciably influence the phosphorescence intensity of either chemical, standards and samples were measured at pH 4.0 to ensure that the CBL was not hydrolysed during the preparation of the sample. A 1 M acetic acid-sodium acetate buffer solution (pH 4.0) was used for this purpose.

The influence of the drying time of the samples on the phosphorescence intensity was studied using a 250 W infrared heat lamp and a hair-dryer operated at 600 W. Different samples, all prepared in the same way, were placed at different distances and for different time intervals. The best results were obtained when the hair-dryer was placed 7 cm above the sample for 3 min.

The sample volume spotted on the solid support also influenced the phosphorescence intensity emitted by the analytes. To test this influence, different volumes of standard solution, ranging between 0.5 and 5.0 μl , and containing 1.0 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of each analyte were tested. It was observed that the phosphorescence intensity increased when the sample volume was increased from 0.5 to 3.0 μl , and decreased very slowly when the sample volume was higher than 4.0 μl . As a consequence, 3.0 μl was adopted as the working volume in subsequent experiments.

The influence of instrumental parameters such as delay and gate times, size of the excitation and emission slits and scan speed was also studied. It was found that the last parameter did not influence appreciably the phosphorescence intensity emitted by the phosphors but, as expected, t_d and t_g exerted a notable influence. To optimise these parameters, different values of t_d (between 0.1 and 0.5 ms) and t_g (between 4.0 and 14.0 ms) were checked, and it was found that 0.1 and 12.0 ms, respectively, produced the maximum phosphorescence intensity for both analytes. The optimum sizes of the excitation and emission slits were 2.5 and 5.0 nm, respectively.

Finally, the quenching effect produced by the presence of atmospheric moisture and oxygen was studied using four samples, each containing 1.0 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of each analyte. The phosphorescence intensities were measured at timed intervals, between 1 and 30 min, counted from the preparation of the samples. These samples were measured with and without quartz plates and with and without a dry N_2 flow. The samples measured using quartz plates (with or without an N_2 flow) showed phosphorescence intensities higher than those without quartz plates (Fig. 4). Hence if the phosphorescence intensity of the sample is measured before 8 min after its preparation, an N_2 flow is not needed, thus simplifying the measurement process.

Application of the PLS-1 model

Optimising the data. A training set of 12 samples, randomly selected, was prepared to obtain the calibration matrix using the experimental data obtained from single and binary mixtures of both pesticides at low, medium and high concentration levels. Table 1 gives the concentrations of each pesticide in each sample of the set. These concentrations were chosen avoiding correlation between the different samples, because this can produce underfitting in the PLS models. The spectra of these samples, obtained under the previously optimised experimental conditions described above, were recorded from 400 to 570 nm, with an interval of 0.5 nm between consecutive points, resulting in 341 experimental points per spectrum.

PLS algorithms consist of two steps, calibration and prediction. In the calibration step we assumed that the

concentration of the different analytes is related to the experimental measurements by the equation

$$c_k = R b_k + e$$

where c_k is the vector of concentrations of analyte k in the N samples of the calibration set, R is the matrix of the instrumental measurements of the N samples in the different channels, e is the vector of the residuals of the concentrations that not are fitted in the model and the coefficients vector b_k is obtained in the calibration step from the expression

$$b_k = R^+ c_k$$

where R^+ is the pseudo-inverse matrix of the matrix R .

In PLS models, R^+ is obtained from the decomposition of the original matrix R taking into account the information contained in the concentration vector c_k of the calibration set. In the prediction step the concentration of the analytes ($k = 1$ for CBL, $k = 2$ for TBZ) are obtained from the matrix expression

$$c_k = r^T b_k + e_k$$

where r^T is the vector of the instrumental measurements of the sample when this is measured in the j wavelength channels. Here, b coefficients were estimated by PLS-1 and the decomposition and regression of the matrix were performed separately for each component,²⁸ taking into account the collinearity between the different wavelength channels. In our case, to select the optimum number of factors, the cross-validation method³² was used and, as the training set was formed with 12 spectra, the calibration was performed on 11 of them, thus predicting the concentration of the excluded standard. The process was repeated 12 times (one for each standard) and the predicted and known concentrations were compared.

The fitness of the PLS model was calculated by the prediction error sum of squares (*PRESS*), applied each time that a new factor was added to the model, using the *F*-statistic as a significance test. Applying the Haaland and Thomas criterion,³³ seven factors (half of the standards + 1) were accepted as the maximum number of initial factors and the optimum number of factors was calculated for the first value of *PRESS* whose *F*-ratio probability fell below 0.75. In this way, three factors were selected as optimum. These three factors should correspond to two analytes plus the background variation of the paper used as the solid support. Table 2 gives the estimated values of residual mean standard deviation absolute (*RMSD*):

$$RMSD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (\hat{c}_i - c_i)^2}{N}}$$

as an indicative value of the average error in the determination of each component and the values of R^2 :

$$R^2 = \frac{\sum_{i=1}^N (\hat{c}_i - c_i)^2}{\sum_{i=1}^N (c_i - \bar{c}_i)^2}$$

indicating that the data are fitted to a straight line.

In order to determine the potential interferences produced for organic species and foreign ions usually present in waters, a systematic study of the effects produced by these chemicals was carried out. Standard solutions containing 1.0 mg l⁻¹ of CBL and 0.8 mg l⁻¹ of TBZ were spotted with the potentially

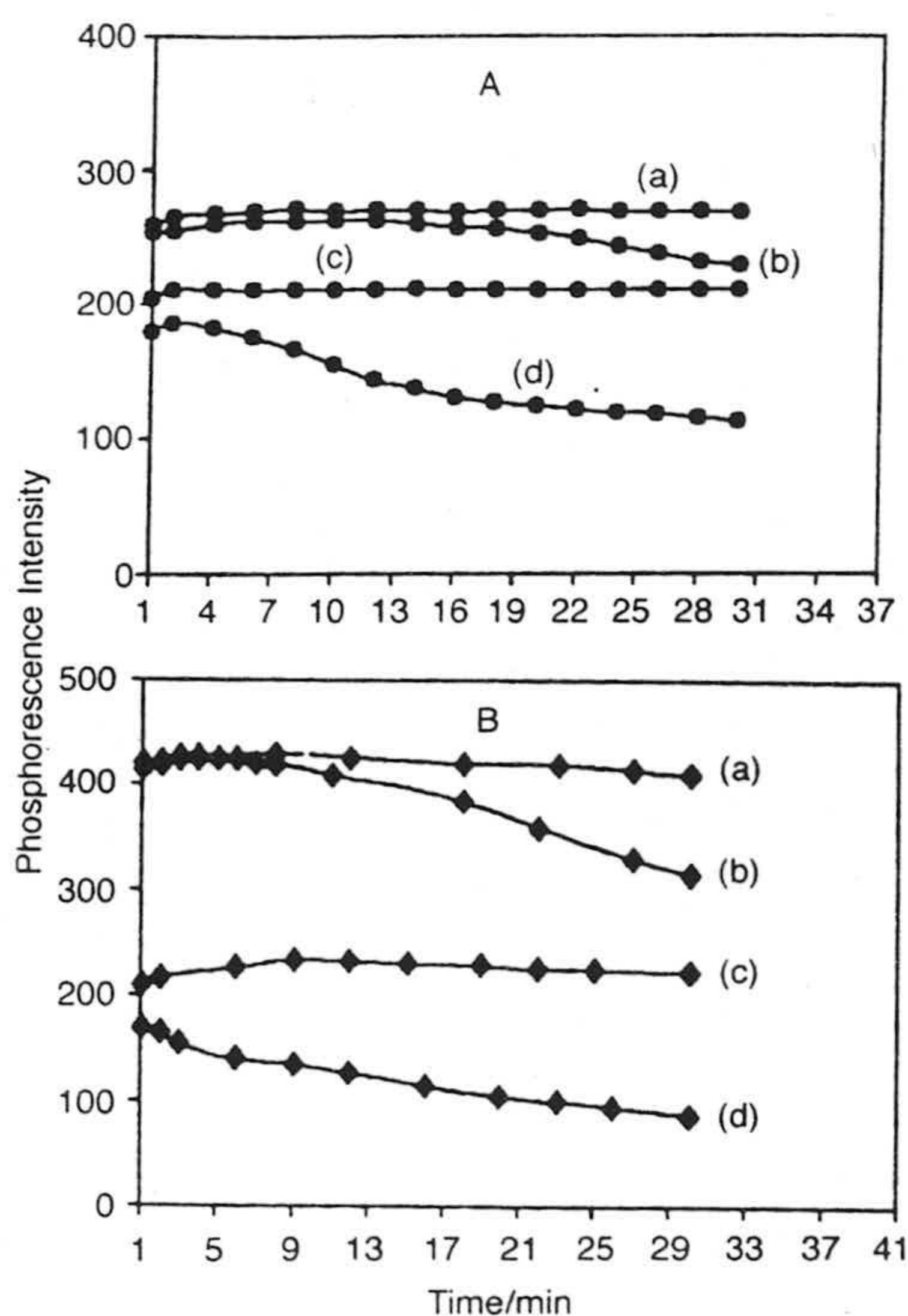


Fig. 4 Influence of time on the phosphorescence intensity emitted by the analytes under different conditions. (A) Carbaryl and (B) thiabendazole. In both cases: (a) with quartz plates and N₂ flow; (b) with quartz plates and without N₂ flow; (c) with N₂ flow and without quartz plates; (d) without quartz plates or N₂.

Table 1 Composition of the training set

Standard	CBL/ $\mu\text{g ml}^{-1}$	TBZ/ $\mu\text{g ml}^{-1}$
1	0.0	0.5
2	0.0	1.1
3	3.5	0.0
4	1.0	0.0
5	2.2	0.7
6	3.8	0.3
7	0.8	1.0
8	2.8	0.8
9	1.4	0.2
10	1.9	0.6
11	3.1	0.4
12	0.4	0.5

Table 2 Statistical parameters of the optimised matrix using the PLS-1 model

Pesticide	No. of factors	<i>RMSD</i> ^a	R^2 ^b
CBL	3	0.22713	0.96912
TBZ	3	0.028233	0.99315

^a Residual mean standard deviation. ^b Square of the correlation coefficient.

Table 3 Effects of foreign ions or organic species on the determination of CBL (1.0 mg l⁻¹) and TBZ (mg l⁻¹)

Ions or species	Tolerance level/ mg l ⁻¹
Humic acids, dichlone, captan, atrazine, morestan, hexametazone, folpet, carbendazime	10.0
SO ₄ ²⁻ , Cl ⁻ , Ca(II), Mg(II), Cu(II)	10.0
Al(III), Be(II), NO ₃ ⁻	5.0
Fe(III), PO ₄ ³⁻ , warfarin	2.0

Table 4 Recovery study of mixtures of TBZ and CBL in tap water samples spotted with one or two components

Sample No. ^a	CBL ^b						TBZ ^b					
	Taken/ mg l ⁻¹	PLS-1/ mg l ⁻¹	RSD (%)	HPLC/ mg l ⁻¹	RSD (%)	P (%) ^c	Taken/ mg l ⁻¹	PLS-1/ mg l ⁻¹	RSD (%)	HPLC/ mg l ⁻¹	RSD (%)	P (%) ^c
1	0.00	(0.01)	—	—	—	—	1.00	0.93	3.1	0.96	4.5	18.4
2	3.00	3.15	2.0	3.10	3.0	27.4	0.50	0.45	4.7	0.47	3.2	8.0
3	2.50	2.64	2.5	2.59	3.4	21.1	0.60	0.63	2.9	0.60	4.9	8.7
4	3.50	3.41	2.3	3.48	3.4	24.2	0.40	0.40	2.9	0.41	3.9	19.0
5	1.00	1.09	3.2	1.08	4.6	64.0	0.60	0.59	2.5	0.61	5.3	29.5
6	0.00	(0.02)	—	—	—	—	0.40	0.39	4.1	0.40	3.1	16.1
7	1.00	1.01	3.5	0.98	5.1	20.8	0.40	0.39	4.8	0.41	2.7	32.0
8	3.80	3.55	6.0	3.60	4.1	60.2	0.00	(0.02)	—	—	—	—
9	2.00	1.97	7.1	2.00	4.5	64.8	0.50	0.48	5.5	0.49	3.7	41.8
10	1.50	1.41	3.4	1.44	4.1	20.4	0.30	0.30	3.1	0.32	5.2	6.6
11	1.80	1.72	4.6	1.75	5.2	31.2	0.00	(0.04)	—	—	—	—
12	2.50	2.41	1.9	2.44	2.4	23.2	0.85	0.87	2.0	0.86	3.9	32.0

^a Samples 1–3, tap water, Granada City; samples 4–6, Genil river water (Granada); samples 7–9, mineral water from Lanjarón (Granada); samples 10–12, mineral water from Fontvella (Gerona). ^b The values in parenthesis are those measured by the method when this compound is not present. ^c P value of the comparison test.

interfering species at a 10.0 mg l⁻¹ concentration and the concentrations of the analytes (CBL and TBZ) were determined using the PLS-1 method under the conditions established above. If interference occurred the concentration level of the foreign species was reduced until the error produced did not exceed ±5.0% in the determination of either of the two analytes. As can be seen in Table 3, the greatest interference was produced by warfarin and Fe(III).

Application of the model to real samples. In order to test the accuracy and applicability of the method, the optimised matrix obtained by the PLS-1 model was applied to the analysis of real samples of different kinds of water. Because the samples of waters did not contain pesticides (or the concentration levels were lower than the detection limit of the method), a recovery study was carried out. These samples (which were different from the 12 samples used to obtain the calibration matrix) were also analysed by using HPLC as a reference method.³⁴ Table 4 gives the results obtained with the two methods. These data are the average values from three measurements of each sample by PLS-1 and HPLC. The results obtained by the two methods were compared statistically and the values of P are included in Table 4.

Conclusions

The use of the quartz plates during the measurement of the phosphorescence of the analytes improves the analytical process because a flow of inert gas is not needed. The PLS-1 method can be applied for the statistical treatment of the experimental spectrophosphometric data obtained from mixtures of phosphors in the solid phase. The use of a readily available filter-paper as a solid support allows for an inexpensive method, the main advantages of which are the sensitivity and selectivity that derive from the phosphorescence technique and the simplicity and speed that derive from the application of PLS-1. In all cases examined the results obtained by PLS-1 and HPLC were similar, as proved by the applied test. However, we are conscious of the need to carry out further work to demonstrate the applicability of the method to other samples under different conditions, and this is our intention.

References

- J. J. Vannelli and E. M. Schulman, *Anal. Chem.*, 1984, **56**, 1030.
- S. Y. Su, E. Asafu-Adjaye and S. Ocaik, *Analyst*, 1984, **109**, 1019.
- R. Q. Aucélio and A. D. Campiglia, *Anal. Chim. Acta*, 1995, **309**, 345.
- T. Vo-Dinh, E. Lue Yen and J. D. Winefordner, *Anal. Chem.*, 1976, **48**, 1186.
- M. C. García-Alvarez Coque, G. Ramis Ramos, A. M. O'Reilly and J. D. Winefordner, *Anal. Chim. Acta*, 1988, **204**, 247.
- S. Scypinski and L. J. Cline Love, *Anal. Chem.*, 1984, **56**, 322.
- S. Scypinski and L. J. Cline Love, *Anal. Chem.*, 1984, **56**, 331.
- W. J. Jin and C. S. Liu, *Anal. Chem.*, 1993, **65**, 863.
- Y. S. Wei, W. J. Jin, R. H. Zhu, C. S. Liu and S. S. Zhang, *Talanta*, 1994, **41**, 1617.
- S. Panadero, A. Gómez-Henz and D. Pérez-Bendito, *Anal. Chem.*, 1994, **66**, 919.
- R. A. Paynter, S. L. Wellons and J. D. Winefordner, *Anal. Chem.*, 1974, **46**, 736.
- R. P. Bateh and J. D. Winefordner, *Talanta*, 1982, **29**, 713.
- S. Su, D. L. Bolton and J. D. Winefordner, *Chem. Biomed. Environ. Instrum.*, 1983, **12**, 55.
- D. L. McAleese and R. B. Dunlap, *Anal. Chem.*, 1984, **56**, 600.
- A. D. Campiglia and C. G. de Lima, *Anal. Chem.*, 1987, **59**, 2822.
- M. E. Díaz-García and A. Sanz-Medel, *Anal. Chem.*, 1986, **58**, 1436.
- M. C. Simeone, A. Gioia and A. D. Campiglia, *Anal. Chim. Acta.*, 1994, **287**, 89.
- C. G. De Lima, M. M. Andino and J. D. Winefordner, *Anal. Chem.*, 1986, **58**, 2867.
- H. Wold, in *Research Papers in Statistics*, ed. F. David, Wiley, New York, 1966, pp. 411–444.
- S. Wold, in *Food Research and Data Analysis*, ed. H. Martens and H. Russwurm, Applied Science, London 1983.
- S. Wold, M. Martens and H. Wold, in *The Multivariate Calibration Problem in Chemistry by PLS*, ed. A. Ruhe and B. Kagstrom, Springer, Heidelberg, 1983, pp. 286–289.
- I. Durán-Merás, A. Muñoz de la Peña, A. Espinosa-Mansilla and F. Salinas, *Analyst*, 1993, **118**, 807.
- A. Espinosa-Mansilla, F. Salinas and I. de Orbe, *Fresenius' J. Anal. Chem.*, 1996, **354**, 245.
- A. Espinosa-Mansilla, F. Salinas and A. Zamoro, *Analyst*, 1994, **119**, 1183.
- A. Espinosa-Mansilla, A. Muñoz de la Peña and F. Salinas, *Anal. Chim. Acta*, 1993, **276**, 141.
- R. G. Brereton, *Analyst*, 1997, **122**, 1521.
- P. W. Araujo, D. A. Cirovic and R. G. Brereton, *Analyst*, 1996, **121**, 581.
- F. R. Burden, R. G. Brereton and P. T. Walsh, *Analyst*, 1997, **122**, 1015.
- C. Demir and R. G. Brereton, *Analyst*, 1998, **123**, 181.
- H. Martens and T. Næs, *Multivariate Calibration*, Wiley, Chichester, 1994.
- L. F. Capitán-Vallvey, F. Ojeda, M. del Olmo, R. Avidad, A. Navalón and T. Vo-Dinh, *Appl. Spectrosc.*, 1998, **52**, 101.
- M. Stone, *J. R. Stat. Soc. B*, 1974, **36**, 111.
- D. M. Haaland and E. V. Thomas, *Anal. Chem.*, 1988, **60**, 1193.
- M. V. Dilna, R. E. Hall, J. D. Shamis and S. A. Whitlock, *J. Chromatogr.*, 1984, **283**, 383.

Paper 8/07825D

APÉNDICE N° 6

Titulo Determination of the Pesticide Morestan Residues by means of a single-use Phosphorimetric Sensor.

Autores: L. F. Capitán-Vallvey, M. K. A. Deheidel, M. D. Fernández and Ramiro Avidad.

Revista: Enviado a la Revista ~~Analytical Chemistry~~.

Analytica Chimica Acta

**DETERMINATION OF THE PESTICIDE MORESTAN BY MEANS OF A
SINGLE-USE PHOSPHORIMETRIC SENSOR**

L.F. Capitán-Vallvey; M.D. Fernández Ramos and R. Avidad *

Department of Analytical Chemistry, University of Granada, Granada 18071 (Spain).

e-mail: lcapitan@goliat.ugr.es

Mahmoud K.A. Deheidel

Department of Chemistry, University of Hebron (Palestine)

Key words. Solid phase room temperature phosphorescence, optical sensors, morestan determination, water analysis.

* Corresponding author: *e-mail: lcapitan@goliat.ugr.es*

Abstract

A new test express procedure to determine the pesticide morestan based on Solid Phase Room Temperature Phosphorescence using a disposable optical sensor is proposed. Device is characterised to be a (5x1 cm) polyester sheet with a (6 mm in diameter and 25 μm in thickness) circular microzone, formed by polyvynylchloride and tributylphosphate as plastizier, adhered on its surface. When the sensor was introduced for two hours in a solution of morestan, this last was fixed in the sensing zone and its phosphorescence emission can be directly measured at $\lambda_{\text{em}}= 520 \text{ nm}$ and $\lambda_{\text{exc}}= 363 \text{ nm}$. Construction, fixation and characteristics parameters of the fixation process of the analyte into the sensor have been studied. The applicable concentration range was 1.0 to 200.0 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ with a detection limit of 0.28 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ and a precision of 2.9% determined as relative standard deviation. The method was applied to the determination of the pesticide in different actual samples of waters (natural, tap, sea, river and wastewater) obtaining percentages of recovery ranged between 89 and 103 %. A study of the interference produced by other pesticides and organic and inorganic species frequently present in these waters, show the selectivity of the method, which was chemiometrically validated.

Introduction

At present, one of the requirements in Analytical Chemistry is the analysis of small amounts (trace levels) of the chemical contaminants presents in natural or waste waters as a consequence of the different human activities. The analytical control of these pollutants require make frequent determinations of chemicals such as heavy metals, pesticides, polycyclic aromatic hydrocarbons or fertilizers in waters coming, among others, from the sewer system of the countries, the manufacturer industries or the farming. The analysis of these samples presents two main problems, the complex composition of the matrix of the sample and the need of to determine the analyte at trace levels. On the other hand, if we want an effective analytical control, the analyses should be frequently realized, and, if possible, with low cost and time consumption. Hence, sensitive, selective, inexpensive and quick methods of analysis using conventional instrumentation, are necessities. Chemical sensors can bring any of the above indicated characteristics (low cost, and speediness and simplicity of handling) and the analytical phosphorescent techniques show the other characteristics required (sensitivity and selectivity).

For these reasons, we have studied and developed a phosphorimetric sensor for the determination of morestan, a pesticide widely used in the farming to control the pest of diverse types of fungus. However, the main objective of this work is not to propose a new method for the determination of morestan, but to develop a analytical methodology founded in the use of single-use chemical sensors, whose analytical signal can be a phosphorescent response allowing a selective determination of intrinsically phosphorescent analytes at trace levels.

The solid surface room temperature phosphorescence offers a sensitive and selective way to develop analytical strategies for development of optical sensors. Phosphorescence has been used to design sensors with application in flow-through and in probes. The more remarkable example of the few intrinsic phosphorescent sensors reported in literature is, probably, the fiber optic sensor for the analysis of PAH fixed on filter paper support based on laser-induced RTP proposed by Campiglia and coworkers¹. More usual are the extrinsic type phosphorimetric sensors in which phosphorescence is originated by complexation. The simplest is based on an organosilicon polymer for the analysis of uranyl in environmental samples based in its extraction as a phosphorescent complex². The use of FIA configurations allow the design of sensors with interesting characteristics for metals, so detection limits of

several tenth of $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, relative standard deviation of 2-3% and response time around 1 min. Between the different reagents we find the use of sulphonic derivatives of oxine retained in an anion exchange resin for aluminum³ and lead⁴; thenoyltrifluoroacetone in a Chelex 100 resin for europium⁵ or 1,4-bis-(1'-phenyl-3'-methyl-5'-pyrazolone-4'-)butanedione for gadolinium.⁶

In a similar way the immobilization of metallic ions allows the determination of organic compounds through complexation, this is the case of tetracyclines using Chelex 100-Eu (III) as sensor phase⁷ or anthracyclines using Amberlite XAD-2-Eu (III).⁸

The second group of phosphorimetric sensors is the RTP quenching-based. The best example is the oxygen probes based in polycyclic aromatic hydrocarbons,⁹ long-wavelength fluorescent indicators,¹⁰ and transition metal chelates.¹¹⁻¹³ The oxygen sensor have been used indirectly to determine cholesterol based in its enzymatic oxidation.¹⁴ Other compounds analyzed by its quenching properties are sulphite¹⁵ and nitrogen oxides.¹⁶

In this paper we study possibility of use polymeric films for the fabrication of membranes that allows the phosphorimetric determination of organic pollutants (such as pesticides). The sensing action is founded in a retention process of the analyte into the membrane and the measurement of the phosphorescence directly emitted by the phosphor. The aim of this work is to develop methods inexpensive, selective and sensitive using conventional instrumentation.

EXPERIMENTAL SECTION

Apparatus and Software

The luminescence spectrometer used to perform the measurements of phosphorescence was a Perkin-Elmer (Norwalk, CT, USA) LS-50 equipped with a xenon discharge lamp with a power equivalent to 20 kW during 8 μs and pulse width at half peak height < 10 μs . The spectrometer was also equipped with a Hamamatsu R298 photomultiplier and two monochromators Monk-Gillieson F/3 and was interfaced to an IBM PC330-100Dx4 microcomputer through a RS232C connection. As software for the acquisition and manipulation of the spectral data, the Perkin-Elmer FL Data Manager software package was used. The spectrometer was daily checked with a P1 solid standard (12.5x12.5x45 mm) containing europium (III) thenoyltrifluoroacetate dissolved in a transparent matrix of poly(methylmethacrylate), supplied by Perkin-Elmer. Other apparatus and

laboratory materials were: a 10 μL micropipette Biohit Proline (Helsinki, Finland), a Crison (Crison Instruments, Barcelona, Spain) digital pH-meter with combined glass-saturated electrode, a Selecta (Selecta, Barcelona, Spain) ultrasonic bath and home made accessories constructed by the authors for the introduction of the sample into the sample holder of the instrument. To measure the thickness of the film of polyvinylchloride that constitutes the zone active of the sensor, a transmission electron microscopy C. Zeiss EM 10C was used.

Software programs used for the statistical treatment of the data were *Statgraphics Plus for Windows 3.1* software package (Statistical Graphics Corporation, U.S., 1994-1997) and *Excel* software package from Microsoft Office 97, ver. 8.0, 1997.

Reagents and materials

A stock solution ($10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) of morestan (Riedel-de-Haën, Seelze, Germany) was prepared by exact weighing and dissolution in absolute ethanol. This solution was stable for two weeks. Daily working solution were prepared by dilution with reverse osmosis quality water (Milli-Ro 12 plus Milli-Q Station from Millipore) maintaining a 10% (v/v) ethanol/water to avoid the potential precipitation of the analyte. Poly(vinylchloride) (PVC) of high molecular weight, tetrahydrofuran and tributylphosphate (TBP), dioctylphthalate (DOP), 2-nitrophenyloctylether (NPOE), tris(2-ethylhexyl)phosphate (TEHP), bis(2-ethylhexyl) sebacate (DOS) all those supplied by Sigma (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, Spain), sheets of polyester type Mylar (Goodfellow, Cambridge, UK) and saturated stock solutions of the following salts: Pb(II) acetate, Tl(I) nitrate, Ag(I) nitrate and KI (all from Merck, Darmstad, Germany) were also used. All reagents were of analytical reagents grade unless stated otherwise.

Preparation of the sensor

The active zone of the sensor was obtained as follows: to 50 mg of poly(vinylchloride) (PVC) (9.2% wt), 490 mg of tributylphosphate (TBP) (90.8% wt) and 1.75 mL of tetrahydrofuran (THF) (in this order) were added, and the mixture was shaken for 2 min. With the aid of a micropipette, $5\mu\text{L}$ of this solution were placed over a sheet (32x18 mm) of polyester type Mylar of 0.5 mm of thickness and the sheet was introduced in a vacuum dryer for 20 min at room temperature, after which the sensor can be used. The physical characteristics of the active zone of the sensor are the follows: solid,

homogeneous, transparent and uncolored circular film (6 mm of diameter and 25 μm of thickness) adhered to the solid support.

Phosphorescence measurements.

The transmitted phosphorescence emission spectra were recorded between 390 and 610 nm with a delay time $t_d = 0.15$ ms and a gate time $t_g = 10$ ms. The scan speed was $240 \text{ nm}\cdot\text{min}^{-1}$ and the excitation and emission slits width were 5 and 10 nm respectively. In order to obtain the spectra, the sensor with the sample was placed in the holder of the spectrometer using for this purpose the accessory that it can see in Figure 1; in this way the plane of the sensor forms two angles of 45° with the excitation and emission beams. 5 min before to carry out the measurement and during the time of recording of the spectrum, a stream of dry nitrogen flows through the sample compartment. The phosphorescence measurements were effected at $\lambda_{\text{exc}} = 363$ nm and $\lambda_{\text{em}} = 520$ nm.

Figure 1

Procedure for samples and standards

In a 100 mL glass vessel, 50 mL of standard solution, or sample solution, containing between 1.0 and $200.0 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ were placed and the sensor, suspended from a support, was introduced into the solution in such a way that its active zone was wetted by the solution. Then the solution was mechanically stirred for 2 h with a magnetic stirrer at 300 rpm, after which the sensor was introduced in a vacuum dryer for 20 min. Ended the dried process the phosphorescent signal of the sensor was measured as above described.

RESULTS AND DISCUSSION

Spectral characteristics

The excitation and emission spectra of the morestan fixed in the sensor show peaks of excitation and emission located at 363 and 520 nm respectively, which relative phosphorescence intensities are about of 10^2 to 10^3 times higher than the values showed by the blank. Using paper as a support these peaks were located at 363 and 527 nm, respectively.¹⁷

Selection of the membrane components

The design of the membrane was conditioned by its capacity to retain the analyte and to show a low phosphorescence background, which depends on the nature of both support and the polymeric matrix. From the supports tested (polyvinylacetate, metacrylate and polyester) the polyester type Mylar (ethylene polyterefthalate) was the material that originates the lower background and for this reason was selected as solid support. On the other hand, the membrane was prepared by selecting of the more appropriate polymer from among polyvinylchloride, polyvinylacetate and polyurethane and the more the appropriate plasticizer from among TBP, DOP, NPOE, TEHP. As polymers we selected polyvinylchloride (PVC) and TBP as plasticizer, using THF as solvent.

Optimization of the experimental parameters.

In order to obtain adequate experimental conditions for the emission of phosphorescence, different parameters were individually studied and optimized. These parameters can be classified in three groups: those related to the design and composition of the membrane (amount of PVC, THF and TBP, volume of the drop deposited on the solid support, and time of drying the sensor in a vacuum drier). Parameters related with the fixation process of the morestan on the sensor (time of fixation, speed of shaking, drying time membrane after equilibration, ionic strength and pH), and instrumental parameters (excitation and emission wavelength, delay and gate times, scan speed, angle formed by the excitation beam and the plane of the sensor and excitation and emission width of slits).

Sensor composition.

In order to optimize the composition of the sensor the influence that the amounts of PVC, TBP and THF exert on the phosphorescence signal were studied. For this purpose, diverse sensors were constructed varying the amount of one of the chemicals and maintaining constant the amounts of the other two chemicals. PVC was tested in a range between 10 and 70 mg, TBP was tested between 0.1 and 0.9 mL, and THF between 0.5 and 4.5 mL. As it can see in figure 2 (X-axis of this figure is not graduated because the units are different for PVC, TBP and THF), the optimum composition of the cocktail to obtain the sensor was 50 mg of PVC, 0.5 mL of TBP and 1.75 mL of THF. This composition was used in the next experiences.

Figure 2

Others parameters, related with the preparation of the sensor and that potentially could influence on its analytical response, are the volumes of cocktail placed in the support and the drying time. Using a solution of optimum composition, several sensors were prepared placing volumes of cocktail ranging between 2 to 12 μL . After the equilibration of these sensors with ($1.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) solutions of MOR, the phosphorescence intensities were measured obtaining the results plotted on the Figure 3. As we can see the phosphorescence intensity remain approximately constant until 5.0 μL , diminishing next due to the increase in the size of the sensing zone that is progressively bigger than the zone lighted by the radiation. We select 5 μL as optimum volume because reduce the standard deviation of measurements.

Figure 3

As the sensor must be totally dried before use, the influence of the way and the time of dried were studied. Two drying conditions were tested: at room pressure and under vacuum. The minimum time to dry the sensor under vacuum was 20 min, and at room pressure was 60 min and consequently the first way was selected.

Fixation process of the morestan in the sensor

Parameters that should influence on the RTP response of the sensor are the follows: equilibration time, pH, ionic strength, heavy atom and drying time of the sensor after the fixation of the analyte.

Figure 4

Figure 4 shows the dependence of the RTP signal on the equilibration time. As it can see the analytical signal increases until 120 min decreasing then slightly until diminish a 10% at 360 min. Two hours was used as adequate time to obtain maximum signal. The influence of pH on the fixation of morestan was studied using MOR solutions with concentration levels ranged between 0.5 and 13.5, adjusted with HCl and NaOH solutions. The phosphorescence intensity was constant at pH values ranged between 3.0 and 7.5 decreasing at values lower than 3.0 and higher than 7.0. This phenomenon can be attributed to the absence of acidic groups in the molecule of MOR. When $\text{pH} > 8$ the phosphorescence intensity measured at $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$ decreases, appearing a new emission at $\lambda_{\text{em}} = 542 \text{ nm}$. This change in the spectral characteristics of

emission could be attributed to the hydrolysis of MOR at $\text{pH} > 8.0$ to form 2,3-dimercapto-6-methylquinoxaline.¹⁸

The role of heavy atom in the RTP emission was studied in two ways: 1) as usually in solution previous to the fixation of MOR in the sensor and 2) introducing the heavy atom as a lipophilic compound into the sensor. As enhancers in solution were tested: Ag(I); Pb(II); Tl(I); Hg(I); Cl^- ; I^- and Br^- observing that Pb(II), Tl(I), Cl^- , I^- , and Br^- do not affect the emission of phosphorescence, whereas Ag(I) and Hg(I) eliminate the emission of phosphorescence. $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{CH}_2)_4$ and $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Br}$ was incorporated to PVC matrix in different percentages, but in all cases the RTP signal do not change. Consequently no heavy atom was used as enhancer of the phosphorescence, similarly as was observed for MOR using paper as support.¹⁷

The influence of the ionic strength on the phosphorescence of MOR was studied using NaCl. Experimental results show that the RTP was independent of the concentration of NaCl until 2.0 M.

It was observed that the RTP signal increase if the sensor was dried before the measurement. This fact could be probably related with the quenching of phosphorescence produced by the water freely dissolved in the membrane of PVC and uptake from aqueous solution by an initial rapid process.^{19,20} In order to dry the sensor after the equilibration process different ways were tested: IR lamp, a warm air stream, and a desiccation with or without vacuum. The best results (a 210% signal increase) were obtained drying for 20 min in a desiccator over CaCl_2 under vacuum (13 mm). An increase in the time of drying do not produces an improvement of the results.

Instrumental parameters

The influence of the delay and gate time, excitation and emission slit width, and the angle formed between the excitation beam and the sensor plane on the phosphorescence emitted, were also studied. To test the influence of the gate time, a delay time of 0.5 ms was fixed and different values of gate time, ranged between 0.05 and 0.5 ms, were checked. The optimum phosphorescent emission was obtained for $t_g = 0.15$ ms. Then, with a gate time of 0.15 ms, different values of delay time ranged between 2 and 11 ms were tested, $t_d = 10$ ms being the value that produced the higher phosphorescent emission.

In order to check the influence of the angles formed between the excitation and emission beams with the plane of the sensor on RTP intensity, different series of

measurements of the phosphorescence intensity were carried out modifying the angle for different values of the width of the slits of excitation and emission. In each series, the values of the slit width were previously fixed and the phosphorescence intensity was measured for different values of the angles α_0 and α_1 (Figure 5).

Figure 5

The experimental data shown that when the relation (slit width of excitation)/(slit width emission) is 1/1 the optimum angle to measure the emission of phosphorescence is 45° . However, if the relation is 1/2 the optimum angle is about 38° and if the relation is 1/3 the optimum angle is about 34° . This fact should be tentatively justified as follows: if we suppose that the intensity of phosphorescence emitted is proportional to the sum of the volumes (V_t) that the excitation and emission beams delimit in the body of the sensor, this phosphorescence intensity must be maximum when $dV_t/d\alpha_0 = 0$. As $V_t = V_{exc} + V_{em} = eL[r_{exc}/\text{sen } \alpha_0 + r_{em}/\text{sen}(\pi/2)]$, where: V_{exc} and V_{em} are the volumes delimited by the excitation and emission beams, e is the thickness of the sensor, α_0 the angle formed between the excitation beam and the plane of the sensor, L is the length of excitation and emission slits and r_{exc} and r_{em} are the excitation and emission slits width respectively, V_t is a maximum when its first derivative with respect to α_0 is zero:

$$\frac{dV_t}{d\alpha_0} = eL \left[\frac{r_{exc} \cos \alpha_0}{\text{sen}^2 \alpha_0} - \frac{r_{em} \text{sen } \alpha_0}{\cos^2 \alpha_0} \right] = 0 \quad (\text{Ec. 1})$$

Ec. 1 can be expressed as follows: $\text{tg}^3 \alpha_0 = \frac{r_{exc}}{r_{em}}$ or:

$$\alpha_0 = \text{arctg} \sqrt[3]{\frac{r_{exc}}{r_{em}}} \quad (\text{Ec. 2})$$

If $r_{exc} = r_{em}$, the angle that produce the optimum emission of phosphorescence is $\alpha_0 = 45^\circ$, but if $r_{exc} = \frac{1}{2} r_{em}$, this angle is $\alpha_0 = 38^\circ 26'$ and when $r_{exc} = \frac{1}{3} r_{em}$, $\alpha_0 = 34^\circ 44'$. These theoretical values to agree with the values experimentally measured and plotted in Figure 6.

Figure 6

Morestan concentration dependence

The relationship between the relative phosphorescence intensity and the concentration of morestan was linear from 1.0 to 200.0 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$. At higher concentrations a concentration quenching effect was observed and the phosphorescence

intensity decreasing a 15.8%, with respect to the expected theoretical value, if the concentration of MOR is 400.0 ng mL^{-1} . In this experience the shaking time of the standard solutions, for the fixation of the analyte, was 2 h.

On the other hand, as the fixation process of the MOR on the sensor can be considered an extraction organic solid-aqueous solution, the constant of the extraction process was calculated carrying out consecutive extractions, with different sensors, from a initial standard solution that containing 200.0 ng mL^{-1} of MOR, applying the procedure above described. In order to calculate the constant of the extraction process (K_D) the following equation was used: $C_n = C_0(1 + r K_D)^{-n}$ where n is the number of extractions effected, C_0 is the initial concentration of the solution (200.0 ng mL^{-1} in our case), C_n is the concentration of analyte in the solution after n extractions, and r is the ratio V_o/V_a (volume of the sensor/volume of aqueous solution). The results obtained (plotted in Figure 7) show than, if the time of equilibration is constant for the consecutive extractions, the constant K_D decreases. This fact can be justified if we have in account that the analytical signal (RPI) depends of two factor: concentration level of analyte and time of equilibration of the sensor with the sample solution, $RPI = f(C,t)$. Consequently, when the concentration level of the analyte diminish, as a consequence of the consecutive extractions, the necessaries equilibration times for total saturation of the sensor should be increase.

Figure 7

Analytical figures of merit

The analytical curve was obtained by means of ten standards, with three replicate of each one standard, whose concentration levels ranged between 0.001 and $0.20 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. The linearity of this analytical curve was tested by applying the *lack-of-fit* as suggested by the Analytical Method Committee^{21,22} and the linear model obtained was $RPI = 1.89 + 2574.57 C$, where, RPI represents the relative phosphorescence intensity (difference between phosphorescence intensity of the sample or standard and phosphorescence intensity of the respective blank), and C the concentration of morestan in the sample or standard expressed in $\mu\text{g mL}^{-1}$. The repeatability of the method, expressed as relative standard deviation (RSD), was obtained from ten standards of MOR whose concentration level was $0.10 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, and the IUPAC detection and quantification limits^{23,24} determined from ten blanks being 0.28 and 1.0 ng mL^{-1} respectively. Table 1 shows these and other analytical parameters.

Table 1

Effect of foreign ions or species

In order to probe the effects that can potentially produce other ions or organic species frequently presents in the actual samples, a systematic study of the effect produced by these species, on the determination of samples containing 100.0 ng mL^{-1} of MOR, was carried out. To perform these tests, the potentially interfering species were tested at $100.0 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ concentration level (or at different concentration levels depending on their respective solubilities), and if interference occurred the concentration of the interferent specie was reduced until produces an error $< 5.0\%$ on the determination of the analyte. The maximum concentration of interferent producing an error $\leq 5.0 \%$ was taken as the tolerance level. Table 2 shows the experimental data obtained with the more frequently species present in the different types of waters used in the application of the method. As we can see in Table 2, the presence of other pesticides that usually interfere in the luminescent (fluorescence and phosphorescence) determination of MOR, with this method do not produce interference, probably due to the absence of heavy ions necessary as enhancer of the phosphorescent signal.

Table 2

APPLICATIONS

The method proposed was applied to the determination of morestan in waters of diverse provenance (tap, river, sea, and waste waters). As the water under study does not contain TBZ over the limit detectable by the method, a recovery study was carried out after the addition of the adequate amounts of the pesticide. The analysis were performed 24 hours after the addition of MOR and the results obtained are summarized in Table 3.

Table 3

In the case of the waste waters included in this Table, the recoveries studies were carried out in samples of water taken above and after of the purification process. The founded percentages of recovery (average of three different determinations) are ranged between 96.1 and 103.1% .

The quality and accuracy of the proposed method were tested by using of the statistical protocol based on standard addition methodology.^{25,26} Standard calibration (SC), standard addition calibration (AC) and Youden calibration (YC) curves were established. The slope, intercept and regression standard deviation for each curve was

calculated by applying the linear regression analysis. By validation of the proposed method we will mean the following: a) homogeneity of variances for all calibration curves, b) similarity of slopes and c) that the value of the intercept obtained from the YC curve is included in the confidence interval value of the SC curve. If these conditions are observed, the accuracy of the method is confirmed by comparison of the analyte content in the different calibrations. Both results are similar and the method is accurate, with a significance level greater than 5 %, if the null hypothesis test is accepted. Table 4 shows the results of the validation study of morestan determination in waters. We found that there is no constant error bias (YB) and there is no significant difference between AC and SC slopes. In all instances t_{cal} is lower than the t_{tab} ($\alpha = 0.05$ and 16 freedom degree).

Table 4

CONCLUSIONS

It is demonstrated that it is possible to design single-use optical sensors that can measure transmitted phosphorescence and which offer a sufficiently good repeatability and a response time that is not excessively long. The sensor can be considered as inexpensive, simple, and quick alternatives to obtain analytical information of pollutants at trace level.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was funded by the General Subdirectorate for Training and Knowledge - sharing of the Spanish Ministry of Education and Culture (Project No. PB96-1404).

References

- (1) Campliglia, A.D.; Vo-Dinh, T. *Talanta*, **1996**, *43*, 1805-
- (2) Arruda, A.F.; Campliglia, A.D.; Chauhan B.P.S.; Boudjouk, P. *Anal.Chim. Acta*, **1999**, *396*, 263-
- (3) Pereiro García, R.; Liu, Y.; Díaz García, M.; Sanz-Medel, A. *Anal.Chem.* **1991**, *63*, 1759-
- (4) San Vicente de la Riva, B.; Costa-Fernandez, J.M.; Pereiro, R.; Sanz-Medel, A. *Anal. Chim. Acta*, **1999**, *395*, 1-
- (5) Lu, J.; Zhang, Z. *Analyst*, **1995**, *120*, 2585-
- (6) Gong, Z.; Zhang, Z. *Mikrochim. Acta*, **1997**, *126*, 117-
- (7) Alava-Moreno, F.; Sanz-Medel, A. *Anal. Chim. Acta*, **1993**, *281*, 367-
- (8) Alava-Moreno, F.; Valencia-Gonzalez, M.J.; Díaz-García, M.E. *Analyst*, **1998**, *123*, 151-
- (9) Ramasamy, S.M.; Hurtubise, R.J. *Talanta*, **1998**, *47*, 971-
- (10) Wolfbeis, O.S.; Carlini, F.M. *Anal. Chim. Acta*, **1984**, *160*, 301-304
- (11) Hartmann, P.; Ziegler, W. *Anal. Chem.*, **1996**, *68*, 4512-
- (12) Liu, Y.M.; Pereiro-García, R.; Valencia-Gonzalez, M.J.; Díaz-García, M.E.; Sanz-Medel, A. *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 836-
- (13) Costa-Fernández, J.M.; Díaz-García, M.E.; Sanz-Medel, A. *Anal. Chim. Acta*, **1998**, *360*, 17-
- (14) Valencia-González, M.J.; Díaz-García, M.E. *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 2726-
- (15) Papkovsky, D.; Uskova, M.A.; Ponomarev, G.V.; Korpela, T.; Kulmala, S.; Guilbault, G.G.; *Anal. Chim. Acta*, **1998**, *374*, 1-
- (16) Papkovsky, D.; Desyaterik, I.V.; Ponomarev, G.V.; Kurochkin, I.L.; Korpela, T. *Anal. Chim. Acta*, **1995**, *310*, 233-
- (17) Capitán-Vallvey, L.F.; Mahmoud K.A.Deheidell; Avidad, R. *Anal. Lett.*, **1998**, *31(15)*, 2767-
- (18) Erewe, F.; Kasper, H. *Pflanzenschutz-Nachrichte.*, **1965**, *18*, 1-
- (19) Li, Z.; Li, X.; Petrović, S.; Harrison, J. *Anal. Chem.*, **1996**, *68*, 1717-1725
- (20) *ibid.* *Anal. Chem.*, **1996**, *68*, 1726-1734
- (21) Analytical Methods Committee, *Analyst*, **1994**, *119*, 2363-
- (22) *Ibid*, *Analyst*, **1988**, *113*, 1469-
- (23) Guidelines for data acquisition, *Anal. Chem.*, **1980**, *52*, 2242-

- (24) Nomenclature, symbols, units and their usage in Spectrochemical Analysis, *Spectrochim. Acta (B)*, **1978**, 33B, 242-
- (25) Cuadros, L.; García, A.M.; Jimenez, C.; Román, M. *Anal. Lett.*, **1993**, 26, 1243-
- (26) Bosque, J.M.; Cuadros, L.; García, A.M. *Recent Res. Devel. In Pure & Applied Anal. Chem.*, **1998**, 1, 11-

Table 1. Analytical Figures of Merit

Intercept	1.89
Slope ($\mu\text{g mL}^{-1}$) ⁻¹	2574.5
Probability level (%) (lack-of-fit test)	91.2
Linear range (ng mL^{-1})	1.0-200.0
Detection limit (ng mL^{-1})	0.28
Quantification limit (ng mL^{-1})	1.0
RSD (%) ^a	2.9

^a Relative Standard Deviation from ten standards (100.0 ng mL^{-1}) of morestan.

Table 2. Effect of foreign species or ions on the determination of 100.0 ng mL⁻¹ of MOR

Foreign species or ions	tolerance level ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Na(I); K(I)	>100
NO ₃ ⁻ ; Cl ⁻	
Cu(II); Be(II); Ca(II); Mg(II)	50
Fe(III); Al(III); HCO ₃ ⁻ ; CO ₃ ⁻²	
Warfarin; Folpet; Lindane; Captan; Benomyl; Humic Acids	
Thiabendazole	25
Carbaryl	20

Table 3. Recovery of morestan in different types of waters

Matrix	Added (ng mL ⁻¹)	Found (ng mL ⁻¹)	Recovery (%)	RDS (%)	
Mineral water (Lanjarón, Granada)	50.0	51.8	103.7	2.65	
	50.0	49.2	98.4		
	50.0	50.5	101.0		
		100.0	96.2	96.2	3.54
		100.0	103.2	103.2	
		100.0	98.8	98.8	
		200.0	193.8	96.9	3.33
		200.0	198.8	99.4	
		200.0	207.0	103.5	
River water (Rio Genil, Granada)	50.0	47.4	94.8	3.30	
	50.0	48.3	96.6		
	50.0	50.6	101.2		
		100.0	98.5	98.5	2.31
		100.0	101.0	101.0	
		100.0	95.6	95.6	
		200.0	191.6	95.8	3.26
		200.0	197.2	98.6	
		200.0	204.6	102.3	
Tap water (Granada)	50.0	49.0	98.0	4.24	
	50.0	47.9	95.8		
	50.0	52.0	104.0		
		100.0	98.9	98.9	3.05
		100.0	101.7	101.7	
		100.0	95.6	95.6	
		200.0	196.7	98.4	1.38
		200.0	201.0	100.5	
		200.0	202.0	101.0	
Mineral water (Fontdor, Gerona)	50.0	48.9	97.8	4.66	
	50.0	52.2	104.4		
	50.0	47.7	95.4		
		100.0	99.2	99.2	3.26
		100.0	103.0	103.0	
		100.0	105.7	105.7	
		200.0	197.0	98.5	3.07
		200.0	209.2	104.6	
		200.0	202.0	101.0	

(Table 3 continued)

Mineral water (Font Vella, Gerona)	50.0	48.3	96.6	3.52
	50.0	51.7	103.4	
	50.0	49.2	98.4	
	100.0	101.0	101.0	4.00
	100.0	105.4	105.4	
	100.0	97.4	97.4	
	200.0	191.9	95.9	4.05
	200.0	200.0	100.0	
	200.0	208.0	104.0	
Waste water (Penitentiary Center of Abolote, Granada) (above purification)	50.0	42.2	84.4	5.36
	50.0	41.1	82.2	
	50.0	46.2	92.4	
	100.0	90.2	90.2	2.77
	100.0	93.5	93.5	
	100.0	88.1	88.1	
	200.0	179.0	89.5	2.50
	200.0	184.0	92.0	
	200.0	189.0	94.5	
Waste water (Penitentiary Center of Abolote, Granada) (after purification)	50.0	48.3	96.6	2.30
	50.0	47.3	94.6	
	50.0	49.6	99.2	
	100.0	101.0	101.0	2.71
	100.0	97.9	97.9	
	100.0	95.6	95.6	
	200.0	203.7	101.8	2.77
	200.0	193.0	96.5	
	200.0	197.2	98.6	

Table 4. Statistics for validation of MOR determination in sea water and waste water

Sample	Parameter	SC	AC	YC
Sea water	Slope(b)	2575.9	2565.3	1044
	n	21	12	4
	SD(b)	28.18	1.0	8.7
	SD(a)	2.65	11.2	2.4
	a	1.97	128.85	0.3
	á	2.23	128.1
	t _{cal}	0.0006
Waste water input	Slope(b)	2575.9	2581.7	1041.3
	n	21	12	4
	SD(b)	28.18	51.9	
	SD(a)	2.65	4.8	
	a	1.97	126.8	1.4
	á	2.23	127.1
	t _{cal}	0.1286
Waste water output	Slope(b)	2575.9	2579.0	1035.9
	n	21	12	4
	SD(b)	28.18	3.3	
	SD(a)	2.65	35.2	
	a	1.97	127.3	3.6
	á	2.23	127.4
	t _{cal}

t_{tab} 2.045 (α 0.05; df 29)

Figure captions

Figure 1. Home made accessory to introduce the sensor into the holder of the spectrometer with a stream of dry nitrogen

Figure 2. Influence of the amount of: PVC, TBP and THF in the phosphorescence intensity of the sensor

Figure 3. Influence of the volume of solution used for the formation of the sensor on the phosphorescence intensity

Figure 4. Influence of the equilibration time on the phosphorescence intensity

Figure 5. Intersection of the excitation and emission beam with the body of the sensor

Figure 6. Phosphorescence intensities as function of the angle formed between the excitation and emission beams and the plane of the sensor and the width slits. Γ_{exc}/Γ_{em} :

A) 1/1; B)1/2; c)1/3

Figure 7. Phosphorescence intensity as function of the successive extractions

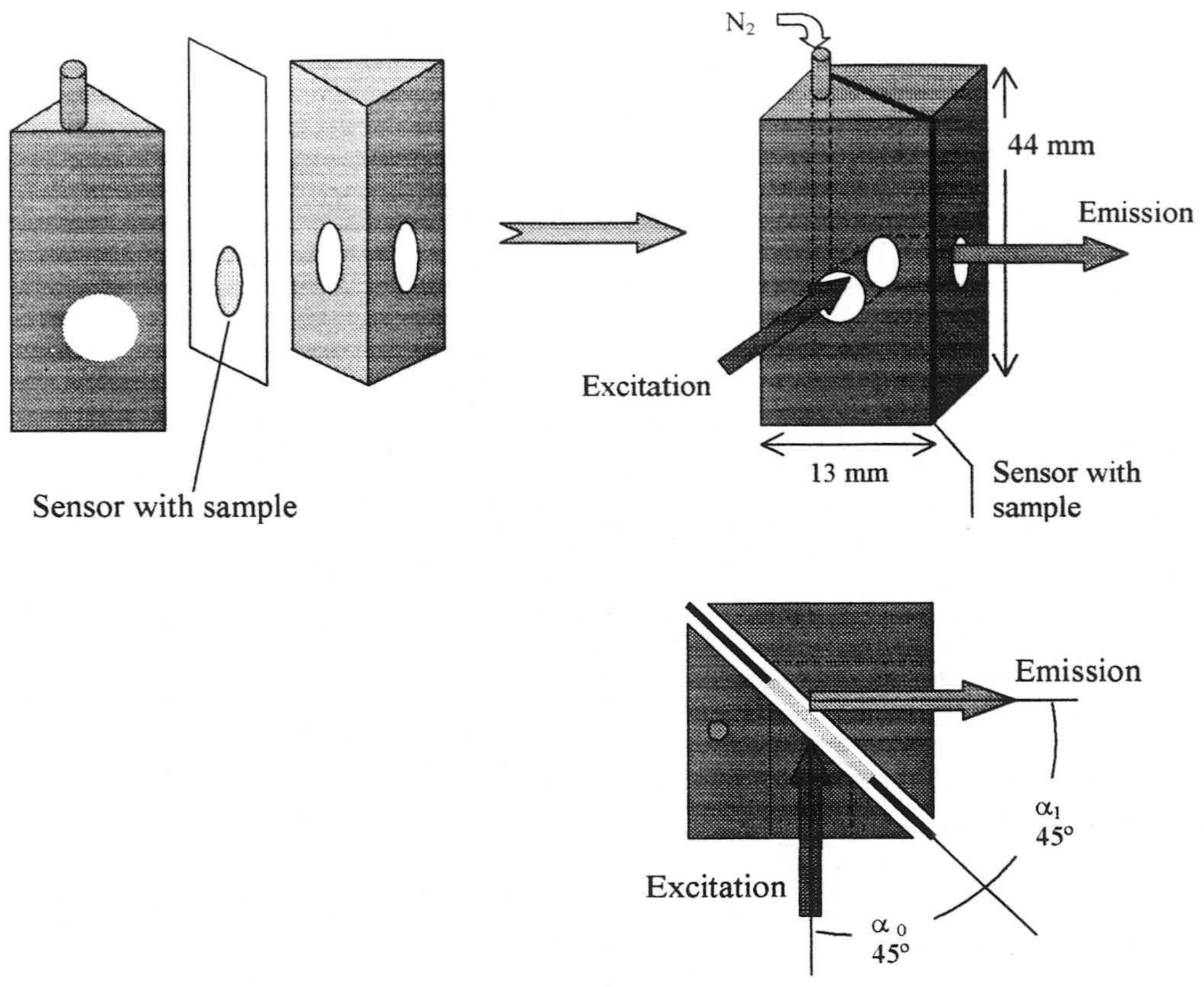


Figure 1

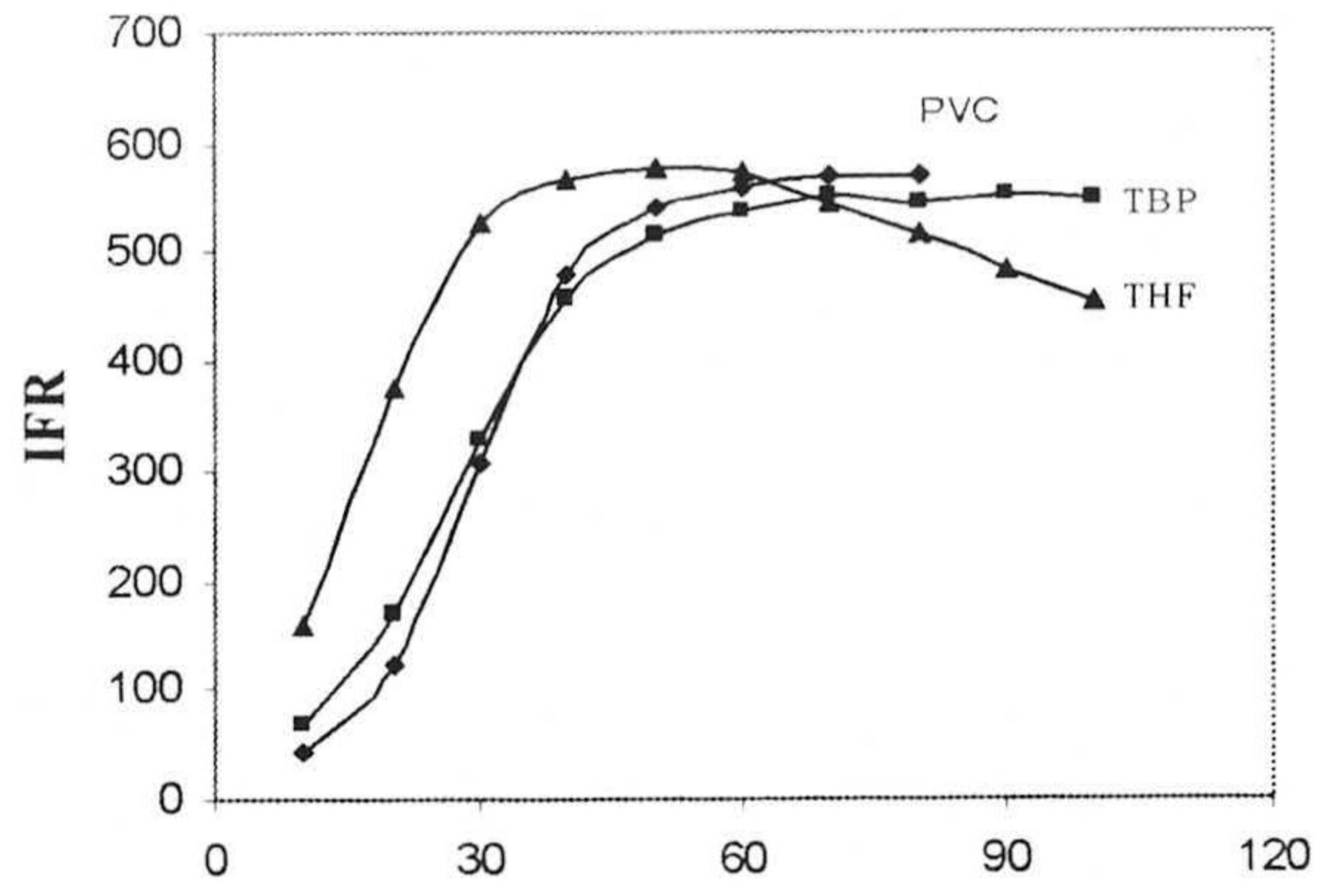


Figure 2

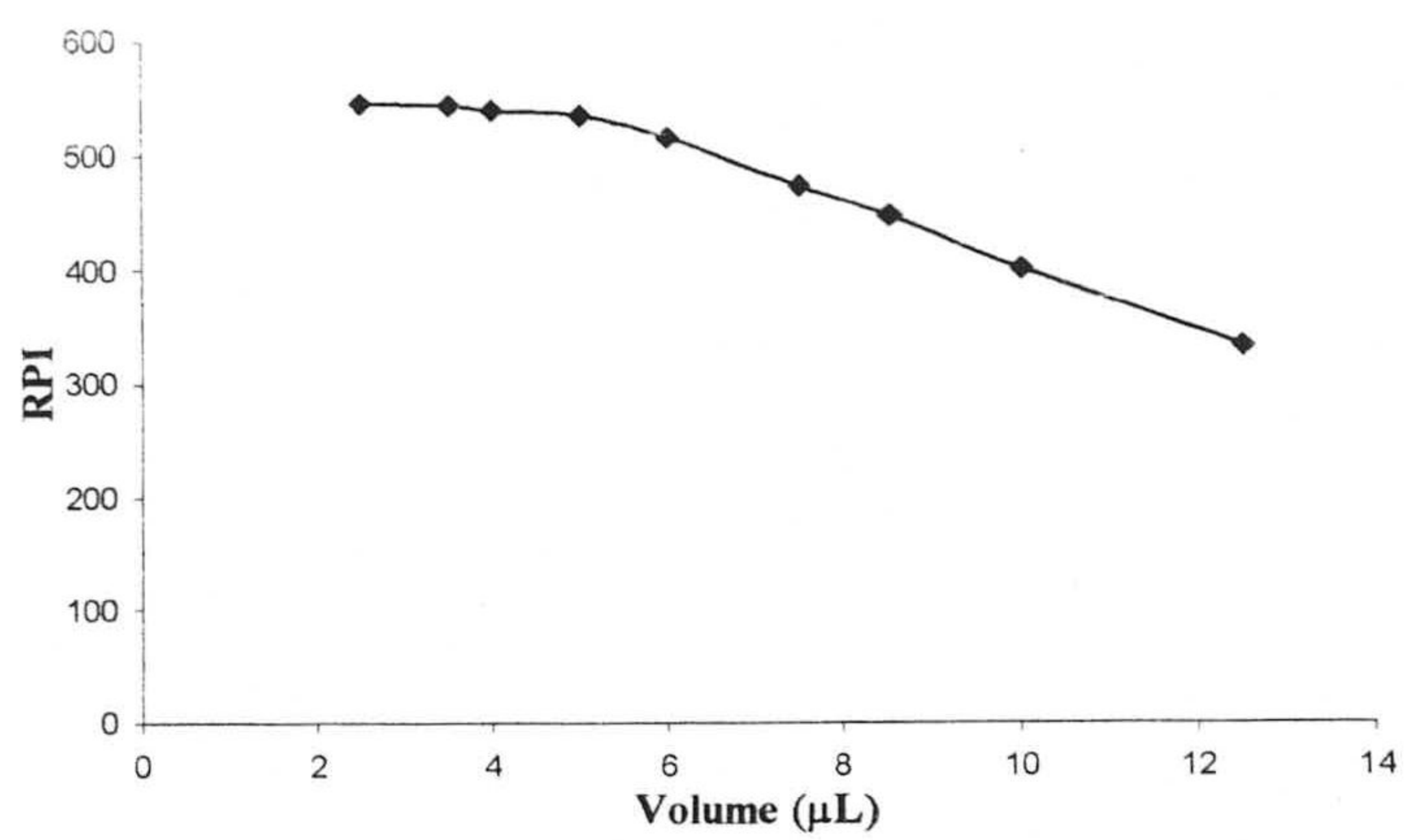


Figure 3

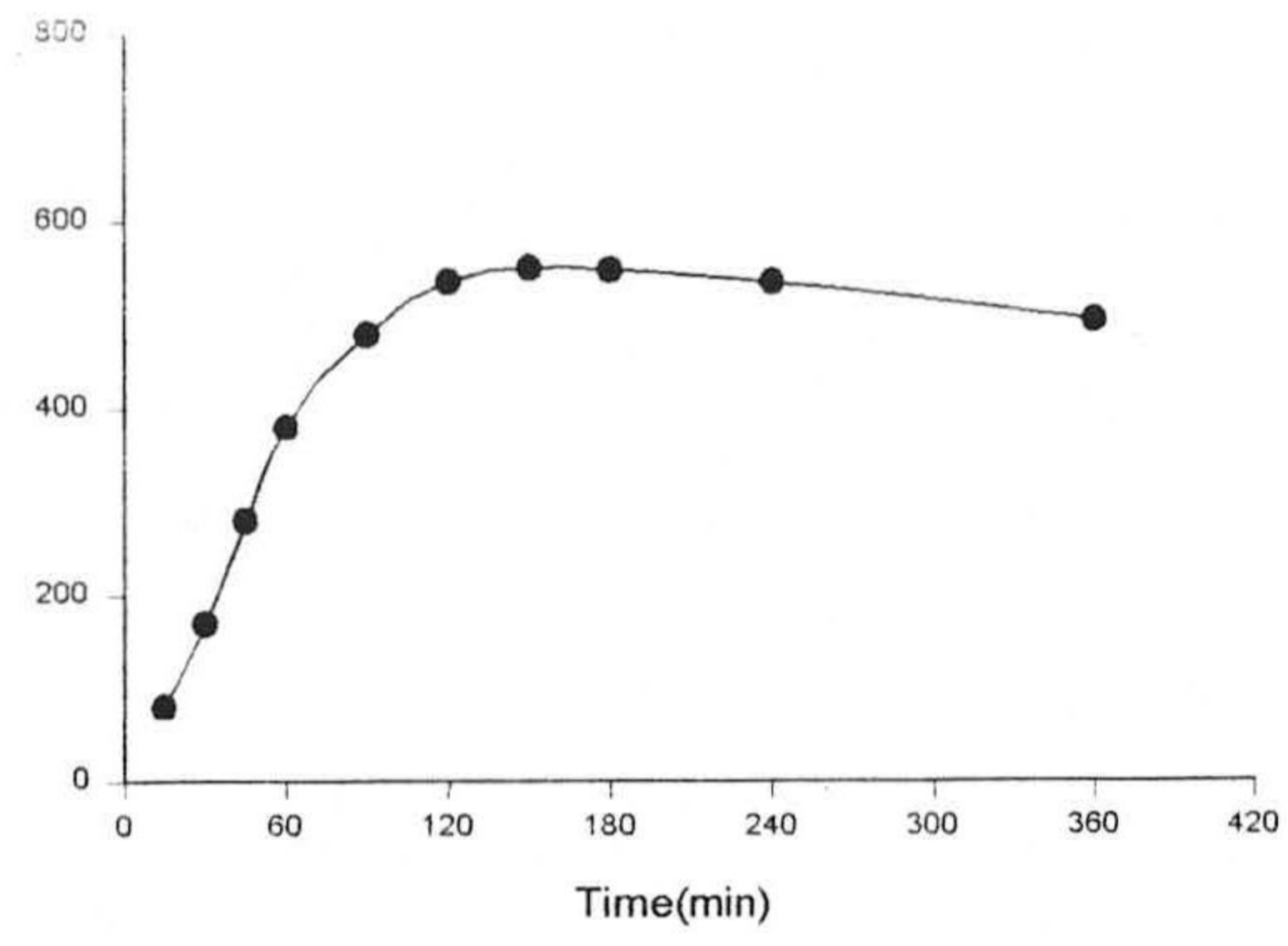


Figure 4

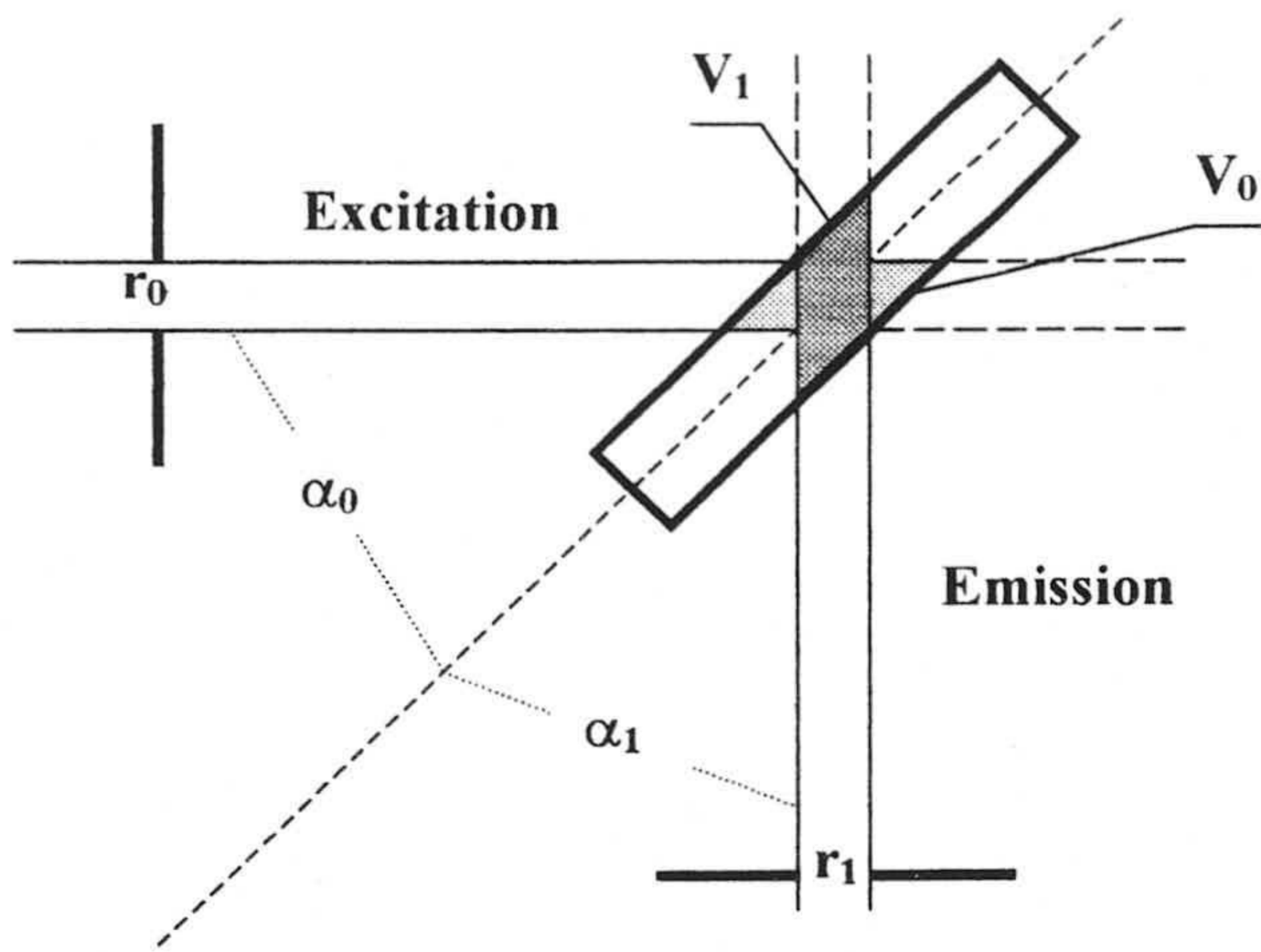


Figure 5

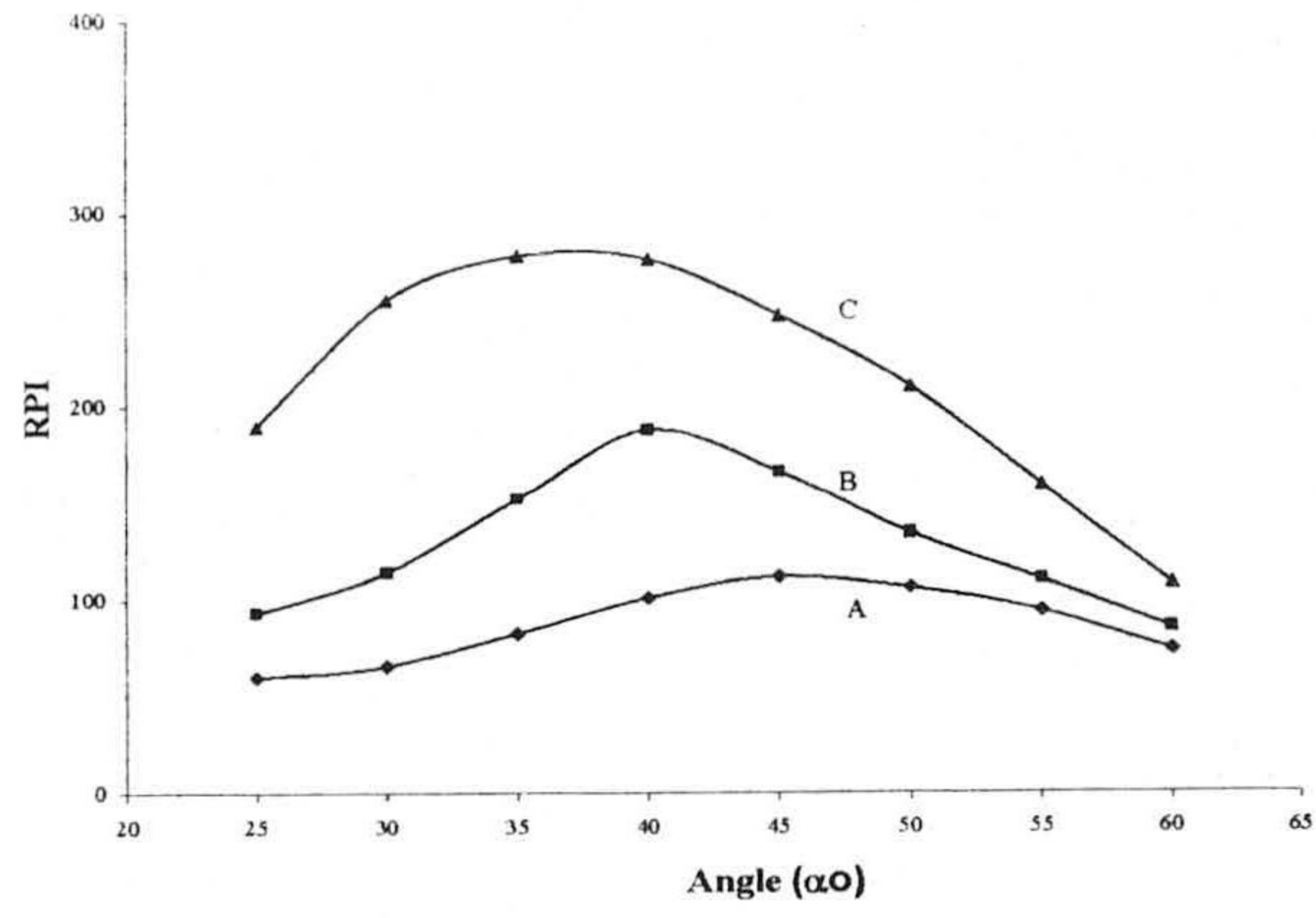


Figure 6

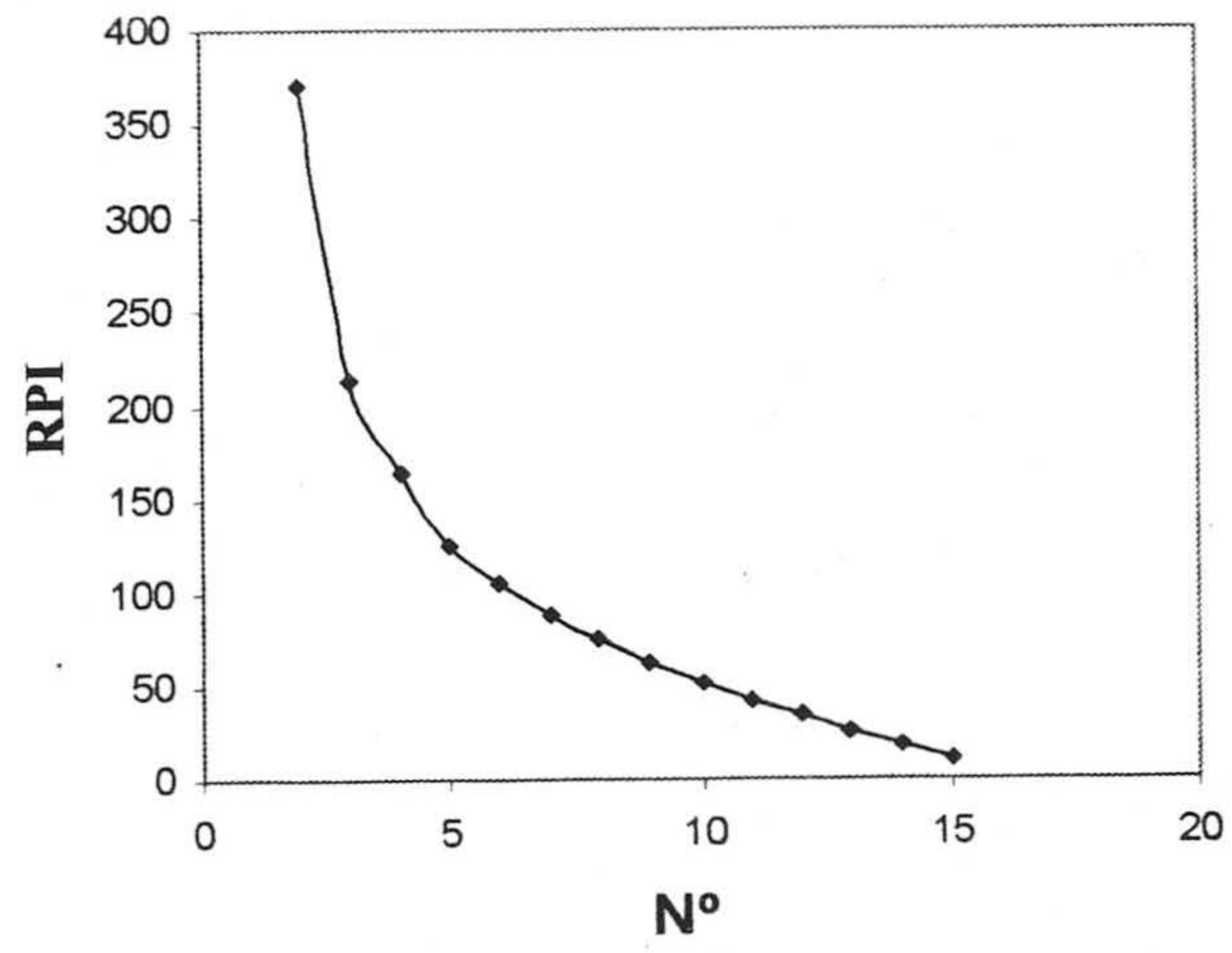


Figure 7

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN

Resumen histórico	2
Clasificación de los pesticidas	4
Uso y modo de actuar de los pesticidas	13
Ventajas e inconvenientes del uso de pesticidas	16
Toxicidad de los pesticidas	20
Degradación de los pesticidas	26
Análisis de pesticidas	28
Cromatografía de gases	30
Cromatografía líquida de alta resolución	31
Cromatografía en capa fina	32
Técnicas luminiscentes	33
Espectrofotometría	42
Procesos fotoluminiscentes	43
Emisión de fosforescencia	47
Factores que afectan a la emisión fosforescente	51
Bibliografía	65

OBJETIVOS DE LA TESIS 69**CAPÍTULO 1**

1. METODOLOGÍA ANALÍTICA.	91
1.1. Espectrofotometría en fase sólida	91
1.2. Preparación de la muestra.	92
1.3. Optimización de los parámetros experimentales.	98
a) <i>Espectros de fosforescencia de excitación y emisión.</i>	98
b) <i>Parámetros instrumentales.</i>	98
c) <i>Parámetros de la muestra.</i>	99
1.4. Medida de la señal analítica.	99
2. TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS ANALÍTICOS	100
2.1. Rechazo de valores anómalos.	101
2.2. Calibración lineal univariante.	102
2.2.1. <i>Desviación estándar de la regresión.</i>	103
2.2.2. <i>Desviación estándar del término independiente.</i>	104
2.2.3. <i>Desviación estándar de la pendiente.</i>	104
2.2.4. <i>Intervalos de confianza para el término independiente y la pendiente.</i>	104
2.2.5. <i>Coefficientes de correlación lineal y de determinación.</i>	105
2.2.6. <i>Desviación estándar de la señal analítica.</i>	105

2.2.7. <i>Desviación estándar de la concentración.</i>	106
2.3. Validación de un método analítico.	106
2.3.1. <i>Parámetros de fiabilidad.</i>	107
2.3.2. <i>Método de calibrado por adición de patrón.</i>	112
2.4. Modelos de calibración multivariante.	119
3. MEDIOS MATERIALES	133
3.1. Instrumentación y material de laboratorio.	133
3.2. Reactivos y disoluciones.	135
3.2.1. <i>Disolventes.</i>	136
3.2.2. <i>Patrones de pesticidas.</i>	136
3.2.3. <i>Disoluciones empleadas.</i>	137
3.2.4. <i>Soporte sólidos ensayados.</i>	138
3.2.5. <i>Ordenadores y programas informáticos.</i>	139
4. MÉTODOS DE CONTRASTE.	140
5. BIBLIOGRAFÍA	141

CAPÍTULO 2

2.1 CARACTERÍSTICAS FOSFORESCENTES DEL TIABENDAZOL	149
2.1.1 Espectros de luminiscencia total del TBZ en fase sólida	150
2.1.2 Espectros bidimensionales del TBZ en fase sólida	153
2.2 OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES EXPERIMENTALES	154
2.2.1 Optimización de variables experimentales de la muestra	154
2.2.1.1 <i>Elección del soporte sólido</i>	154
2.2.1.2 <i>Selección del metal pesado</i>	155
2.2.1.3 <i>Influencia de la concentración de metal pesado</i>	156
2.2.1.4 <i>Influencia del volumen de disolución del metal pesado</i>	158
2.2.1.5 <i>Influencia del uso de láminas de cuarzo y atmósfera de N₂</i>	159
2.2.1.6 <i>Influencia del pH del medio</i>	161
2.2.1.7 <i>Influencia de la fuerza iónica del medio</i>	162
2.2.1.8 <i>Influencia del volumen de muestra depositado en el papel</i>	163
2.2.1.9 <i>Influencia del tiempo de secado</i>	163
2.2.2 Optimización de variables instrumentales	164
2.2.2.1 <i>Optimización del ancho de rendijas</i>	165
2.2.2.2 <i>Optimización de los tiempos de retraso y lectura del detector</i>	165
2.3 PROCEDIMIENTO OPERATORIO	166

2.4	RELACIÓN ENTRE CONCENTRACIÓN Y SEÑAL ANALÍTICA	167
2.5	PARÁMETROS ANALÍTICOS	168
2.5.1	Recta de calibrado	168
2.5.2	Linealidad	170
2.5.3	Sensibilidad	170
2.5.4	Límites de detección y cuantificación	170
2.5.5	Rango dinámico lineal	171
2.5.6	Precisión	171
2.5.7		
2.6	ESTUDIO DE INTERFERENCIAS	173
2.7		
2.8	APLICACIONES ANALÍTICAS	174
2.8.1	Determinación de TBZ en aguas	174
2.8.1.1	<i>Aguas minerales, de río y potable</i>	174
2.8.1.2	<i>Agua de mar</i>	175
2.8.2	Determinación de TBZ en productos vegetales	181
2.9	VALIDACIÓN DEL MÉTODO MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN	185
	BIBLIOGRAFÍA	187
 CAPÍTULO 3		
3.1	CARACTERÍSTICAS FOSFORESCENTES DEL CARBARIL	191
3.1.1	Espectro de luminiscencia del CBL en fase sólida	192
3.1.2	Espectros bidimensionales del CBL en fase sólida	194
3.2	OPTIMIZACIÓN DE LAS VARIABLES EXPERIMENTALES	195
3.2.1	Optimización de variables experimentales de la muestra	196
3.2.1.1	<i>Elección del soporte sólido</i>	196
3.2.1.2	<i>Selección del átomo pesado</i>	197
3.2.1.3	<i>Influencia de la concentración de átomo pesado</i>	197
3.2.1.4	<i>Influencia del volumen de disolución de átomo pesado</i>	199
3.2.1.5	<i>Influencia del uso de láminas de cuarzo</i>	200
3.2.1.6	<i>Influencia del pH</i>	201
3.2.1.7	<i>Influencia de la fuerza iónica</i>	203
3.2.1.8	<i>Influencia del volumen de muestra</i>	204
3.2.1.9	<i>Influencia del tiempo de secado</i>	204
3.2.2	Optimización de variables instrumentales	206
3.2.2.1	<i>Rendijas de excitación y emisión</i>	206

3.2.2.2	<i>Tiempos de retraso y lectura del detector</i>	207
3.3	PROCEDIMIENTO OPERATORIO	207
3.4	ESTUDIO DE RELACIÓN ENTRE CONCENTRACIÓN Y SEÑAL ANALÍTICA	207
3.5	PARÁMETROS ANALÍTICOS	209
3.5.1	Recta de calibrado	209
3.5.2	Linealidad	211
3.5.3	Sensibilidad	211
3.5.4	Límites de detección y cuantificación	211
3.5.5	Rango dinámico lineal	212
3.5.6	Precisión	212
3.6	ESTUDIO DE INTERFERENCIAS	213
3.7	APLICACIONES ANALÍTICAS	214
3.7.1	Determinación de CBL en aguas	215
3.7.1.1	<i>Aguas minerales, del río Genil y potable</i>	215
3.7.1.2	<i>Agua de mar</i>	216
3.7.2	Determinación de CBL en productos agrícolas	217
3.7.2.1	<i>Determinación de CBL en patatas</i>	218
3.7.2.2	<i>Determinación de CBL en arroz y trigo</i>	219
3.8	VALIDACIÓN DEL MÉTODO PROPUESTO MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN	220
	BIBLIOGRAFÍA	222
CAPÍTULO 4		
4.1	CARACTERÍSTICAS FOSFORESCENTES DEL WARFARINA	225
4.1.1	Espectros bidimensionales del WAR en fase sólida	225
4.2	OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES EXPERIMENTALES	226
4.2.1	Optimización de variables experimentales de la muestra	227
4.2.1.1	<i>Elección del soporte sólido</i>	227
4.2.1.2	<i>Selección del átomo pesado</i>	228
4.2.1.3	<i>Influencia de la concentración de átomo pesado</i>	229
4.2.1.4	<i>Influencia del volumen de disolución del átomo pesado</i>	230
4.2.1.5	<i>Influencia del uso de láminas de cuarzo sobre la intensidad de fosforescencia.</i>	231

4.2.1.6	<i>Influencia del pH del medio</i>	232
4.2.1.7	<i>Influencia de la concentración de NaOH</i>	233
4.2.1.8	<i>Influencia del orden de adición de los reactivos</i>	234
4.2.1.9	<i>Influencia de la fuerza iónica del medio</i>	235
4.2.1.10	<i>Influencia del volumen de muestra depositado en el papel</i>	235
4.2.1.11	<i>Influencia del tiempo de secado</i>	236
4.2.2	Optimización de variables instrumentales	237
4.2.2.1	<i>Optimización del ancho de rendijas</i>	237
4.2.2.2	<i>Optimización de los tiempos del detector</i>	238
4.3	PROCEDIMIENTO OPERATORIO	239
4.4	ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE CONCENTRACIÓN Y SEÑAL ANALÍTICA	239
4.5	PARÁMETROS ANALÍTICOS	241
4.5.1	Recta de calibrado	241
4.5.2	Linealidad	243
4.5.3	Sensibilidad	243
4.5.4	Límites de detección y cuantificación	243
4.5.5	Rango dinámico lineal	244
4.5.6	Precisión	244
4.5.7		
4.6	ESTUDIO DE INTERFERENCIAS	245
4.7	APLICACIONES ANALÍTICAS	247
4.7.1	Determinación de WAR en aguas	247
4.7.1.1	<i>Aguas minerales, de río y potable</i>	247
4.7.1.2	<i>Agua de mar</i>	248
4.7.2	Determinación de WAR en suero sanguíneo.	249
4.8	VALIDACIÓN DEL MÉTODO	258
	BIBLIOGRAFÍA	261
	CAPÍTULO 5	
5.1	CARACTERÍSTICAS FOSFORESCENTES DEL MORESTAN	265
5.1.1	Espectros de luminiscencia total del MOR en fase sólida	265
5.1.2	Espectros bidimensionales del MOR en fase sólida	267
5.2	OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES EXPERIMENTALES	268
5.2.1	Optimización de variables experimentales de la muestra	269

5.2.1.1	<i>Elección del soporte sólido.</i>	269
5.2.1.2	<i>Selección del metal pesado</i>	270
5.2.1.3	<i>Uso de láminas de cuarzo para medir la fosforescencia.</i>	271
5.2.1.4	<i>Influencia del pH del medio</i>	272
5.2.1.5	<i>Influencia de la fuerza iónica del medio</i>	273
5.2.1.6	<i>Influencia del volumen de muestra depositado en el papel.</i>	274
5.2.1.7	<i>Influencia del tiempo de secado.</i>	275
5.2.2	Optimización de variables instrumentales	276
5.2.2.1	<i>Optimización del ancho de rendijas</i>	276
5.2.2.2	<i>Optimización de los tiempos del detector</i>	277
5.3	PROCEDIMIENTO OPERATORIO	278
5.4	ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE CONCENTRACIÓN Y SEÑAL ANALÍTICA	278
5.5	PARÁMETROS ANALÍTICOS	279
5.5.1	Recta de calibrado	279
5.5.2	Linealidad	281
5.5.3	Sensibilidad	281
5.5.4	Límites de detección y cuantificación	282
5.5.5	Rango dinámico lineal	282
5.5.6	Precisión	283
5.5.7		
5.6	ESTUDIO DE INTERFERENCIAS	284
5.7	APLICACIONES ANALÍTICAS	286
5.7.1	Determinación de MOR en aguas	282
5.7.1.1	<i>Aguas minerales, de río y potable</i>	286
5.7.1.2	<i>Agua de mar</i>	287
5.7.2	Aplicación a la determinación de MOR en productos agrícolas	293
5.7.3		
	BIBLIOGRAFÍA	296

CAPÍTULO 6

6.1	OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES EXPERIMENTALES	300
6.1.1	Optimización de variables experimentales de la muestra.	301
6.1.1.1	<i>Elección del soporte sólido.</i>	301
6.1.1.2	<i>Selección del metal pesado</i>	301
6.1.1.3	<i>Influencia del uso de láminas de cuarzo y atmósfera de N₂</i>	302
6.1.1.4	<i>Influencia del pH</i>	304
6.1.1.5	<i>Influencia del volumen de muestra</i>	305

	<i>6.1.1.6. La influencia del tiempo de secado</i>	305
6.2	PROCEDIMIENTO OPERATORIO	307
	6.2.1. Optimización de la matriz de calibración	307
	6.2.2. Determinación de ambos pesticidas en una mezcla sintética aplicando el modelo PLS-1.	309
6.3	APLICACIÓN DEL MÉTODO PLS-1 A LA RESOLUCIÓN DE LA MEZCLA CBL Y TBZ EN MUESTRAS REALES DE AGUA DE DISTINTAS PROCEDENCIA.	311
6.4	VALIDACIÓN DEL MÉTODO PROPUESTO MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR)	312
	BIBLIOGRAFÍA	313
	CAPÍTULO 7	
7.1	CARACTERÍSTICAS FOSFORESCENTES DEL MORESTAN	317
7.2	OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES EXPERIMENTALES	319
	7.2.1 Preparación del sensor.	320
	7.2.1.1. Selección de los constituyentes de la zona sensora.	320
	7.2.1.1.1 Influencia de la cantidad de PVC	321
	7.2.1.1.2 Influencia de la cantidad de tetrahidrofurano	322
	7.2.1.1.3 Influencia del tributilfosfato	323
	7.2.1.1.4 Influencia del volumen de cocktail	324
	7.2.1.1.5 Tiempo de secado de la membrana	325
	7.2.2 Variables que influyen en la interacción analito-sensor	326
	7.2.2.1 Influencia de átomo pesado	326
	7.2.2.2 Forma de equilibración	328
	7.2.2.3 Influencia del tiempo de agitación	329
	7.2.2.4 Influencia del pH del medio	329
	7.2.2.5. Influencia de la fuerza iónica	331
	7.2.2.6 Influencia del secado tras la equilibración	331
	7.2.3 Variables instrumentales.	333
	7.2.3.1 Influencia de una corriente de nitrógeno seco.	333
	7.2.3.2 Optimización las rendijas de excitación y de emisión.	334
	7.2.3.3 Optimización de los tiempos del detector.	334
	7.2.3.4 Influencia del ángulo de incidencia de la radiación.	335
	7.2.3.5	
7.3	PROCEDIMIENTO OPERATORIO	339

7.4	ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE CONCENTRACIÓN Y SEÑAL ANALÍTICA	340
7.5	PARÁMETROS ANALÍTICOS	342
7.5.1	Función de calibrado	342
7.5.2	Linealidad	344
7.5.3	Sensibilidad	344
7.5.4	Límites de detección y cuantificación	344
7.5.5	Rango dinámico lineal	345
7.5.6	Precisión	345
7.6	ESTUDIO DE INTERFERENCIAS	347
7.7	APLICACIONES ANALÍTICAS	348
7.7.1	Determinación de MOR en aguas	348
7.7.1.1	<i>Aguas minerales, de río y potable</i>	348
7.7.1.2	<i>Agua de mar</i>	349
7.7.1.3	<i>Aplicación a aguas residuales</i>	355
	BIBLIGRAFÍA	367
	CONCLUSIONES	369



Biblioteca Universitaria de Granada



01052636