

Universidad CEU-Cardenal Herrera

Departamento de Farmacia



Desarrollo de nuevos métodos en flujo
continuo (multiconmutación y
multibombeo) aplicados a la determinación
de pesticidas por quimioluminiscencia
directa y fotoinducida

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Dña. Inmaculada Sahuquillo Ricart

Dirigida por:

Dr. D. José Vicente García Mateo

VALENCIA

2015

Memoria presentada por Dña. M^a Inmaculada Sahuquillo Ricart para optar al grado de Doctora en Farmacia.

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología (proyecto BQU2002-04248-C02-02) y por la Universidad CEU-Cardenal Herrera (proyecto PRUCH02/17).



CEU
*Universidad
Cardenal Herrera*

D. JOSÉ VICENTE GARCÍA MATEO, Catedrático del Departamento de Farmacia de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad CEU-Cardenal Herrera,

CERTIFICA:

Que la presente Memoria titulada *“Desarrollo de nuevos métodos en flujo continuo (multiconmutación y multibombeo) aplicados a la determinación de pesticidas por quimioluminiscencia directa y fotoinducida”*, de la que es autora Dña. M^a Inmaculada Sahuquillo Ricart, ha sido realizada bajo mi dirección, y reúne las condiciones científicas y formales para ser defendida ante el tribunal correspondiente, a fin de obtener el Grado de Doctora en Farmacia.

Y, para que conste a los efectos oportunos, firmo la presente en Moncada, a 25 de noviembre de 2014.

Fdo.: José Vicente García Mateo

A Estanis,

Tanis y Lola

Agradecimientos

Al finalizar este trabajo pienso, que sin la participación de muchas personas e instituciones, no hubiese sido posible llevarlo a cabo.

En primer lugar, y de una manera especial, a mi director de tesis, el Dr. José Vicente García Mateo, por la ayuda prestada durante todo este tiempo y el apoyo para poder finalizar este trabajo. Agradecerle la disponibilidad y paciencia (que ha sido mucha), las sugerencias y las correcciones, que han culminado en la presente Memoria, fruto de un trabajo exigente y enriquecedor.

A mis padres, porque se han encargado día a día de recordarme que debo terminar lo que empiezo y sé la ilusión que les hace la finalización de este trabajo. Al resto de mi familia, que me ha apoyado y comprendido en todo momento.

A Estanis, por el apoyo y comprensión durante este tiempo, y por tu constante motivación; y a mis hijos, Tanis y Lola, que a pesar de sus constantes interrupciones hacen que cada día sea mejor.

Al equipo de técnicos de laboratorio, José Antonio, Ana, Mila, Vanesa y Cristina, gracias por esa ayuda durante las largas sesiones de trabajo en el laboratorio y esos momentos de cháchara que hemos tenido.

Pienso, que cuando uno ha concluido los estudios universitarios, constituye una gran oportunidad poder realizar un trabajo de investigación antes de comenzar la ansiada vida laboral; este tiempo te permite conocer cómo funciona una universidad, especialmente el mudo de la investigación, y al personal que trabaja y estudia en ella.

Durante estos años he podido conocer a mucha gente, algunos con los que ya no tengo contacto, pero todos ellos hicieron que los inicios fueran inolvidables.

Y como no, a ese grupo de los Ceudianos: Eli, Carlitos, Vero, Milix y Moni, por esos momentos inolvidables y los que nos quedan por vivir; chicas ¡ahora sí podemos poner fecha y destino!

A Gerardo y a M^a José, por su inestimable contribución a la presente Memoria reflejada en los estudios de conectividad.

A la Universidad CEU-Cardenal Herrera, por poner todos los medios personales y materiales a mi alcance.

A todos, muchas gracias.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I	
INTRODUCCIÓN A LOS PESTICIDAS	
1.1. Introducción a los pesticidas.....	11
1.1.1. Definición de pesticida.....	11
1.1.1.1. Componentes de un plaguicida comercial.....	14
1.1.2. Clasificación de los pesticidas.....	15
1.1.2.1. Clasificación cronológica.....	15
1.1.2.2. Clasificación toxicológica.....	16
1.1.2.3. Clasificación según su vida media de efectividad.....	22
1.1.2.4. Clasificación según el destino de su aplicación.....	23
1.1.2.5. Clasificación según acción específica.....	24
1.1.2.6. Clasificación según su estructura química.....	24
1.1.3. Efecto de los plaguicidas sobre el medioambiente y la salud humana....	36
1.1.4. Legislación aplicable a pesticidas.....	39
1.1.5. Determinación de pesticidas.....	41
1.1.5.1. Técnicas analíticas utilizadas en el análisis de pesticidas.....	46
1.2. Metodologías en flujo continuo: F.I.A., multiconmutación, multibombeo...	55
1.2.1. Principios del Análisis por Inyección de Flujo.....	55
1.2.2. Multiconmutación en flujo	62
1.2.2.1. Aplicaciones del análisis por multiconmutación.....	67
1.2.3. Multibombeo en sistemas de flujo.....	91
1.2.3.1. Aplicaciones del análisis por multibombeo.....	93
1.2.4. Aportaciones científicas más relevantes a la multiconmutación y al multibombeo.....	101
1.3. Quimioluminiscencia y técnicas en flujo continuo.....	106
1.3.1. Fundamento y mecanismos de las reacciones quimioluminiscentes.....	109
1.3.2. Requisitos para la emisión quimioluminiscente.....	113
1.3.3. Factores que influyen en la emisión quimioluminiscente.....	115
1.3.4. Reacciones quimioluminiscentes.....	116
1.3.5. Características de la quimioluminiscencia como técnica analítica.....	123
1.3.6. Aspectos operativos instrumentales.....	126
1.3.6.1. Instrumentación básica.....	126
1.3.6.2. Procedimiento en estático.....	128
1.3.6.3. Procedimiento en flujo continuo.....	128
1.3.7. Luminiscencia fotoinducida.....	138
1.3.7.1. Ventajas de la quimioluminiscencia fotoinducida.....	141
1.3.7.2. Aspectos operativos e instrumentales.....	142

1.3.8. Aplicaciones de la quimioluminiscencia fotoinducida en flujo continuo a la determinación de pesticidas.....	146
1.4. Topología molecular y Química Analítica.....	149
1.4.1. Conceptos fundamentales.....	149
1.4.2. La matriz topológica.....	152
1.4.3. Índices topológicos.....	153
1.4.4. Tratamiento informático.....	155
1.4.4.1. Obtención de los índices topológicos.....	156
1.4.4.2. Obtención de las funciones discriminantes.....	156
1.4.4.3. Diagramas de distribución.....	159
1.4.5. Aplicaciones de la conectividad molecular a la Química Analítica.....	160
<i>CAPÍTULO II</i>	
OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	
2.1. Objetivos.....	165
2.2. Plan de trabajo.....	166
<i>CAPÍTULO III</i>	
MATERIALES Y MÉTODOS	
3.1. Materiales.....	173
3.1.1. Instrumentación analítica.....	173
3.1.2. Material FIA, multiconmutación y multibombeo.....	174
3.1.3. Reactivos.....	174
3.1.4. Software.....	175
3.2. Métodos.....	177
3.2.1. Proceso de optimización.....	177
3.2.2. Optimización del sistema de flujo.....	177
<i>CAPÍTULO IV</i>	
ESTUDIO DE LA QUIMIOLUMINISCENCIA FOTOINDUCIDA EN PESTICIDAS	
4.1. Introducción.....	183
4.1.1. Montaje de flujo continuo.....	185
4.1.2. Perfil de multiconmutación.....	186
4.1.3. Selección de parámetros químicos y físicos.....	188
4.1.4. Pesticidas estudiados.....	192
4.2. Resultados de la quimioluminiscencia fotoinducida de pesticidas.....	211
4.2.1. Estudio quimioluminiscente de pesticidas utilizando como medio agua.....	227
4.2.2. Estudio quimioluminiscente de pesticidas utilizando como medio NaOH.....	232

4.2.3. Estudio quimioluminiscente de pesticidas utilizando como medio H_2O_2	237
4.2.4. Estudio quimioluminiscente de pesticidas utilizando como medio Fe(III).....	243
4.2.5. Estudio quimioluminiscente de pesticidas utilizando como medio Fe(II).....	248
4.2.6. Referencias bibliográficas sobre la quimioluminiscencia de los pesticidas ensayados.....	253
4.3. Conclusiones.....	256

CAPÍTULO V

CONECTIVIDAD MOLECULAR APLICADA A LA PREDICCIÓN DE LA QUIMIOLUMINISCENCIA FOTOINDUCIDA DE PESTICIDAS

5.1. Introducción.....	261
5.2. Cálculo de descriptores e índices topológicos.....	262
5.3. Análisis lineal discriminante.....	264
5.4. Predicción de la quimioluminiscencia fotoinducida de pesticidas por conectividad molecular.....	271
5.5. Conclusiones.....	273

CAPÍTULO VI

DETERMINACIÓN DE IMIDAZOLINONAS POR QUIMIOLUMINISCENCIA FOTOINDUCIDA

6.1. Características generales de las imidazolinonas.....	277
6.2. Métodos analíticos en la determinación de imidazolinonas.....	279

EXPERIMENTAL

6.3. Ensayos previos.....	281
6.4. Optimización de parámetros físico-químicos.....	285
6.4.1. Influencia del tiempo de fotoirradiación.....	286
6.4.2. Optimización de la concentración de oxidante.....	286
6.4.3. Estudio de fotosensibilizadores.....	287
6.4.4. Reoptimización del tiempo de fotodegradación.....	290
6.5. Optimización del sistema de flujo.....	291
6.5.1. Optimización del caudal del sistema de flujo.....	292
6.5.2. Optimización de los perfiles de inserción.....	293
6.6. Resumen de los parámetros físico-químicos y de flujo para el montaje optimizado.....	296
6.7. Características analíticas.....	297
6.8. Aplicaciones analíticas.....	300
6.9. Conclusiones.....	301

CAPÍTULO VII

DETERMINACIÓN DE AUXINAS POR QUIMIOLUMINISCENCIA DIRECTA

7.1. Auxinas, reguladores del crecimiento vegetal.....	307
7.1.1. Características generales de las auxinas.....	308
7.2. Métodos analíticos para la determinación de auxinas.....	309

EXPERIMENTAL

7.3. Estudios previos y selección del sistema oxidante.....	310
7.3.1. Estudios previos.....	310
7.3.2. Selección del sistema oxidante.....	312
7.4. Optimización del sistema de flujo.....	314
7.4.1. Optimización del montaje y secuencias de multiconmutación.....	314
7.4.2. Optimización del tiempo de integración.....	317
7.4.3. Optimización de parámetros de flujo.....	319
7.4.3.1. Optimización de la frecuencia de pulsos de las bombas solenoides.....	319
7.4.3.2. Optimización del número de inserciones de pesticida.....	320
7.4.3.3. Optimización del número de inserciones del sistema oxidante.....	322
7.5. Estudio del sistema oxidante.....	323
7.5.1. Estudio del sistema oxidante $\text{KMnO}_4/\text{H}_2\text{SO}_4$ para IAA.....	323
7.5.2. Estudio del sistema oxidante $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{NaOH}$ para IBA.....	325
7.6. Estudio de sensibilizadores.....	328
7.6.1. Adaptación del montaje para el estudio de sensibilizadores.....	328
7.7 Aplicaciones analíticas del método.....	330
7.7.1. Estudio de interferentes.....	332
7.7.2. Muestras reales.....	332
7.7.2.1 Determinación de IAA e IBA en muestras reales.....	333
7.8. Conclusiones.....	335

CAPÍTULO VIII

CONCLUSIONES FINALES

8.1. Conclusiones finales.....	339
ARTÍCULOS PUBLICADOS RELACIONADOS CON LA TESIS DOCTORAL.....	347
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....	353
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	363

Abreviaturas y acrónimos

A: Amperometría.

AAS: Espectrofotometría de absorción atómica.

AES: Espectrometría de emisión atómica.

AFS: Espectrometría de fluorescencia atómica.

ALD: Análisis lineal discriminante.

ATR FTIR: Reflectancia atenuada del infrarrojo mediante transformada de Fourier.

C: Conductimetría.

CCDs: Dispositivos de carga acoplada.

CE: Electroforesis capilar.

CG/CL: Cromatografía de gases/Cromatografía líquida.

DL50: Dosis letal 50.

ECD: Detector de captura de electrones.

ELISA: Ensayo por inmuno absorción ligado a enzimas.

ET AAS: Espectrometría de absorción atómica con atomización electrotérmica.

ETV-ICP-MS: Vaporización electrotérmica-espectroscopía de emisión con plasma acoplado inductivamente- espectrometría de masas.

F : Fluorescencia.

FAAS: Espectrometría de absorción atómica con llama.

FIA: Análisis por inyección de flujo.

FLD: Detector de fluorescencia.

HG AFS: Espectrometría de absorción atómica por generación de hidruros.

HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Resolución.

ICP-OES: Espectrometría de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente.

IR: Infrarrojo.

ISE: Electrodo selectivo de iones.

L.O.V.: Lab-On-Valve.

LIF: Fluorescencia inducida por láser.

LMR: Límite máximo de residuos.

MC: Multiconmutación.

MP: Multibombeo.

MS: Espectrometría de masas.

PMT: Tubo fotomultiplicador.

PSVI: Instrumento portátil para voltamperometría de redisolución.

PTFE: Politetrafluoroetileno (Teflón).

QL: Quimioluminiscencia.

QSAR: Relación cuantitativa estructura-actividad.

R_f: Índices de retención para la cromatografía de capa fina.

R_i: Índices de retención para la cromatografía de gases.

S: Espectrofotometría.

SFMB: Sistema de flujo por multibombeo.

SFMP: Sistema de flujo por multiconmutación.

SIA: Análisis por inyección secuencial.

T: Turbidimetría.

TID: Detector termoiónico.

t_r: tiempo de retención.

UV-vis: Ultravioleta-visible.

V: Voltamperometría.

INTRODUCCIÓN

Introducción

La Química Analítica es la rama de la Química que tiene como finalidad el estudio de la composición química de un material o muestra, mediante diferentes métodos de laboratorio.

La finalidad de la Química Analítica en primer lugar es asegurar un nivel alto de exactitud en los resultados generados con el deseado nivel de incertidumbre; esta finalidad implica una merma en las propiedades complementarias (rapidez, bajo coste y factores personales); otra finalidad es resolver problemas analíticos generados por problemáticas económico-sociales o científico-técnicas.

De forma general pueden describirse los objetivos de la Química Analítica como la obtención de más información (bio)química, de mejor calidad (objetivos mayorizantes), utilizando cada vez menos material, esfuerzo, coste y riesgo para el operador y el medio ambiente (objetivos minorizantes).

Las tendencias de la Química Analítica reflejan tanto los objetivos mayorizantes como los minorizantes además de tener en cuenta las finalidades de esta disciplina [1].

El desarrollo de la calidad como objetivo mayorizante, depende del grado de novedad introducida y de la capacidad de resolución de problemas analíticos. Son dos los motores que propician el desarrollo analítico de calidad:

- Avances en otras áreas científico-técnicas (materiales, tecnología).

- Planteamiento de nuevos problemas analíticos originados por necesidades económico-sociales (necesidad de obtener respuestas rápidas y fiables, ej. control de alimentos) o científico-técnicas (necesidad de herramientas analíticas fiables para monitorizar procesos de producción).

En el desarrollo de los objetivos minorizantes se contempla la *automatización* (reducción de la intervención humana), para operaciones previas al proceso analítico, en la medida de la señal y toma y tratamiento de datos, automatización integral (uso de analizadores), la *miniaturización* (disminución del tamaño de equipos), y la *simplificación* (disminución de la envergadura del proceso).

Debido al creciente número de controles analíticos requeridos en áreas como el medio ambiente, así como a la actual disponibilidad comercial de una variedad instrumental, se ha propiciado el desarrollo de técnicas automatizadas de análisis, entre ellas el F.I.A., S.I.A., L.O.V, **multiconmutación** y **multibombeo**: son económicas, con funcionamiento simple y gran versatilidad, además proporcionan un elevado grado de automatización y miniaturización.

Por otra parte, los **pesticidas** han revolucionado la agricultura hasta tal punto que han llegado a ser indispensables en muchos casos. Pese a que los beneficios obtenidos a partir del uso de pesticidas son numerosos, la utilización a escala mundial de cantidades crecientes de estos compuestos, ha dado origen a un conjunto de problemas que afectan al medio ambiente y a la salud humana.

Los métodos de análisis de residuos de pesticidas tienen su papel más relevante en el control de los alimentos y aguas destinados para consumo humano y, de forma especial, en el análisis de frutas y hortalizas así como de alimentos procesados tales como zumos o vinos, ya que son los que reciben habitualmente más aplicaciones durante su producción. Estos métodos comprenden una etapa de extracción y/o preconcentración, un *clean-up* o purificación, para eliminar los potenciales interferentes que hayan podido ser coextraídos con los pesticidas de interés, y posteriormente, la determinación por una técnica cromatográfica, fundamentalmente cromatografía de gases (CG) o cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), o bien mediante una técnica electroforética, como la electroforesis capilar (CE)[2]. También, para aumentar la sensibilidad y selectividad que exige el análisis de multiresiduos de pesticidas en muestras medioambientales, se han popularizado cada vez más las técnicas cromatográficas acopladas (CL/CL o CL/CG) [3] y las denominadas *hyphenated techniques*, las cuales combinan técnicas cromatográficas y espectrométricas [4].

Entre las técnicas analíticas, en los últimos años, ha aumentado el interés de la **quimioluminiscencia** (QL) para fines analíticos (más de 22.000 trabajos publicados en la última década). Los métodos quimioluminiscentes se basan en la medida de la radiación electromagnética emitida en el transcurso de una reacción química, lo cual permite cuantificar, en principio, en calidad de analito, cualquiera de las sustancias que intervienen en la reacción. Se trata de métodos que presentan una elevada sensibilidad y selectividad, y con bajos límites de detección y amplios intervalos de linealidad. Además, son muy económicos y fáciles de aplicar [5].

Actualmente, una tendencia general en Química Analítica va orientada al desarrollo de métodos analíticos que cumplan con los principios fundamentales de la química sostenible (*Green Chemistry*), entre ellos, la reducción de residuos a través del empleo de metodologías y sistemas de detección que permitan una disminución de la escala de análisis. Un método analítico con estos objetivos minorizantes supone el empleo de pequeños volúmenes de muestra y reactivos, así como una reducción significativa de los niveles de concentración de ambos. En este sentido, la combinación de la QL con las técnicas en flujo continuo, como por ejemplo el FIA, la multiconmutación o el multibombeo, puede resultar muy ventajosa. Además, considerando que a menudo la especie química responsable de la emisión quimioluminiscente tiene un tiempo de vida corto, el **tándem QL-técnicas en flujo continuo** [5] presenta unas ventajas operativas incuestionables frente a los métodos alternativos en estático.

La **fotodegradación** (proceso de exposición a luz que conduce a la degradación de ciertas sustancias, lo que provoca transformaciones que afectan a su composición original, modificando sus propiedades iniciales) se ha mostrado muy eficaz en el proceso de tratamiento y purificación de aguas residuales. La fotocatalisis heterogénea está despertando creciente interés ya que puede emplearse para tratar mezclas complejas de contaminantes, incluyendo compuestos disueltos que no se degradan eficientemente a través de métodos convencionales de tratamiento, y que incluso, permiten la desinfección al destruir bacterias y virus. La radiación electromagnética, particularmente el espectro UV-vis, “confinada” y “dispensada” de forma controlada por medio de fotorreactores intercalados en el proceso de fotodegradación *on-line*, se comporta como un reactivo analítico más, y confiere a esta nueva tecnología un

importante valor agregado medioambiental, contribuyendo de forma notable al desarrollo de métodos limpios, conforme a los principios de la química sostenible [6].

Desde un punto de vista analítico, la implementación de fotorreactores en un sistema de flujo continuo permite llevar a cabo una transformación rápida de la estructura química de los compuestos, generando en el proceso de fotólisis nuevas estructuras (analitos) susceptibles de ser determinados por técnicas analíticas espectroscópicas tales como la fluorimetría [7] y la quimioluminiscencia [8], con el consiguiente aumento de la sensibilidad y selectividad en la determinación analítica [9].

La **topología molecular** analiza las posiciones de los átomos dentro de las moléculas. Partiendo de una representación algebraica (matricial) de un compuesto, es posible definir una serie de “índices topológicos” que lo caracterizan estructuralmente.

Una vez obtenido un índice (o varios), se establecen correlaciones entre ellos y diferentes propiedades moleculares, para grupos de compuestos más o menos homogéneos; así es posible enunciar ecuaciones que relacionan tales propiedades con la estructura molecular. Estas ecuaciones se conocen como “funciones de conectividad” (la **conectividad molecular** representaría pues el “ensamblaje” topológico entre los elementos). Si se calculan entonces los valores de los índices de nuevas moléculas, es decir de moléculas no utilizadas en la correlación, y se sustituyen en la ecuación, se podrá predecir el valor de la propiedad correlacionada para ese nuevo compuesto, el cual puede incluso no tener aún una existencia física [10].

La conectividad molecular se ha aplicado ampliamente en la predicción de efectos terapéuticos de medicamentos y en el diseño de nuevos fármacos [10,11], y en menor medida, en la predicción de propiedades analíticas, básicamente en el estudio y predicción de los fenómenos de adsorción y reparto en procesos cromatográficos [12-15], y más recientemente, en la predicción de la quimioluminiscencia de fármacos y pesticidas [16].

Los trabajos que conforman la presente tesis doctoral, recogen e integran los **tópicos analíticos** mencionados anteriormente, los cuales de forma individualizada pueden ser considerados como tendencias analíticas vigentes y prometedoras, a tenor del número y actualidad de los trabajos publicados en los diferentes temas. Se trata de líneas de investigación en las cuales se sigue profundizando tanto en sus fundamentos teóricos como en nuevas aplicaciones.

La presente Tesis Doctoral se enmarca dentro del proyecto BQU2002-04248-C02-02 (*"Desarrollo de Nuevos Métodos Automatizados de Análisis en Flujo Continuo Asistidos por Procedimientos de Diseño Molecular (Conectividad Molecular). Aplicación a la Determinación de Pesticidas con Menor Impacto Mediambiental"*) financiado por del Ministerio de Ciencia y Tecnología.

El doctorando, durante su período formativo, ha llevado acabo una estancia investigadora de 4 meses en la Universidad de Paris 7, Denis Diderot, en los laboratorios ITODYS (Interfaces Traitements, Organisation et Dynamique des Systemes), Paris (Francia), bajo la supervisión del Dr. Jean Jackes Aaron, referencia

internacional en el estudio de la fluorescencia fotoinducida y su aplicación a la determinación de pesticidas mediante FIA (Análisis por Inyección en Flujo).

CAPÍTULO I
INTRODUCCIÓN
A LOS PESTICIDAS

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN A LOS PESTICIDAS

1.1. Introducción a los pesticidas

1.1.1. Definición de pesticida

El control de las plagas es una parte esencial para el desarrollo de cada país, ya que dañan los cultivos y transmiten enfermedades. El 20% de la cosecha agrícola potencial se pierde en el propio campo, por la acción solapada e implacable de los insectos, hongos, moluscos, virus, roedores e hierbas dañinas; y todavía otro 10% más, acaba siendo destruido en los silos y almacenes por causas análogas. Las plagas o pestes dan al traste, pues, con casi la tercera parte del esfuerzo agrícola de la Humanidad, con cuyo producto podrían mantenerse seiscientos millones de personas. De ahí el rigor y la decisión con que las distintas ramas de la Ciencia y la Técnica se han enfrentado con el problema.

De estas ramas, la Química ha respondido suministrando al agricultor unas herramientas químicas imprescindibles: los plaguicidas.

Los plaguicidas son sustancias de origen natural o sintético que sirven para combatir todo tipo de enfermedades y parásitos que dañan directamente o indirectamente los cultivos, o pueden transmitir enfermedades a seres humanos. La FAO/OMS (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación/

Organización Mundial de la Salud) da la siguiente definición de plaguicida: “*Sustancia o mezcla de ellas, estudiada para prevenir, controlar o destruir cualquier especie de planta o animal indeseable, incluyendo también aquellas destinadas a regular el crecimiento de plantas, defoliantes y desecantes*” [17].

En el siglo XIX, se inició la aplicación programada de productos químicos en la agricultura. Se redescubrió la utilidad del azufre (Homero mencionaba al azufre para prevenir plagas, s. VIII a.C), del azufre con cal (polisulfuros de calcio) y de la mezcla de Bordeaux (sulfatos básicos de cobre). Los compuestos usados eran de naturaleza inorgánica.

Los primeros compuestos orgánicos fueron generalmente sustancias derivadas o mezclas de sustancias químicas muy poco refinadas. Los extractos de tejidos vegetales molidos resultaban útiles para el control de insectos. Estos extractos se usaban en la agricultura. Entre estos extractos estaban los piretroides, los rotenoides y los nicotinoides, que todavía se obtienen en gran parte en base a extractos vegetales.

Aunque se conocían ya algunas sustancias orgánicas sintéticas, la gran revolución en el uso de los productos orgánicos en la agricultura coincide aproximadamente con el inicio de la Segunda Guerra Mundial. Los descubrimientos más importantes fueron el DDT (Müller – 1939), el 2,4 – D (patente de Jones –1945), el hexacloruro de benceno (desarrollo de la ICI la ICI-Imperial Chemical Industries, hacia 1940) y los ésteres de fosfatos orgánicos (Schräder – iniciados en los años 30).

A pesar que cada vez se usan los pesticidas menos y más controladamente, se produce un aumento del consumo de estos a nivel mundial, esto es debido a que cada vez más, los países subdesarrollados tienen más acceso a este tipo de compuestos.

Evolución del mercado Fitosanitario Mundial

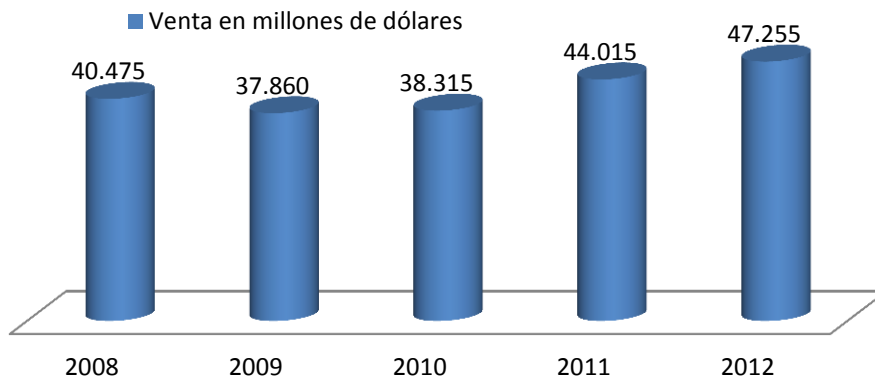


Figura 1. Evolución del mercado fitosanitario mundial.

Es posible que en España, en los últimos años, la cantidad de producto utilizado en el mercado ha disminuido, posiblemente por el desarrollo de productos que cada vez requieren menores cantidades de aplicación y son más efectivos en sus objetivos de proteger a los cultivos y plantas (AEPLA: Asociación Empresarial para la Protección de la Planta) (figura 2).

Evolución del Mercado Fitosanitario en España

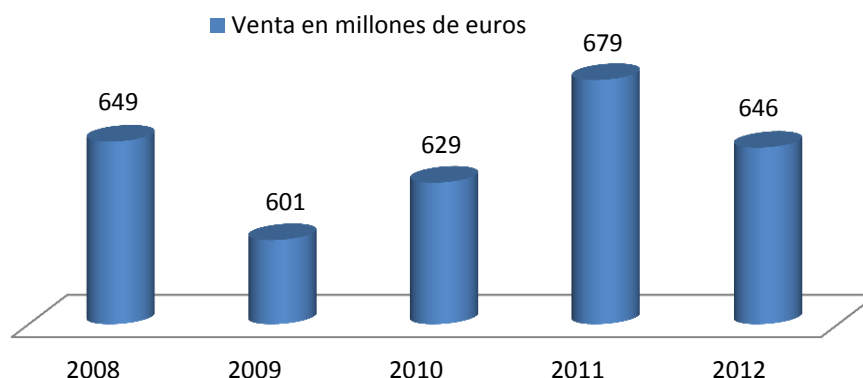


Figura 2. Evolución del mercado fitosanitario en España.

1.1.1.1. Componentes de un plaguicida comercial

Los plaguicidas, en su presentación comercial, están compuestos por una serie de sustancias que los hacen más efectivos y reducen su peligrosidad: una sustancia química (ingrediente activo-técnico), debidamente acondicionada en un vehículo adecuado (ingrediente inerte, coadyuvantes), con las cualidades necesarias para conseguir una acción efectiva.

Ingrediente activo-técnico

Ejerce su acción plaguicida. Puede ser un producto orgánico o inorgánico, natural, sintético o biológico, con un grado de pureza establecido.

Ingredientes inertes

Aquellas sustancias o materiales que, unidos a los ingredientes activos para la preparación de formulaciones, permiten modificar sus características de dosificación o de aplicación. Facilitan el reparto y la fitotoxicidad (p. ej. los disolventes).

Adyuvantes o Coadyuvantes

Ayudan a que el producto sea más eficaz, modificando las propiedades físicas o químicas de la materia activa (p. ej. tensoactivos, fluidificantes y estabilizantes).

Aditivos:

Tienen diversas funciones: colorantes, repelentes olorosos, etc.

1.1.2. Clasificación de los pesticidas

Los pesticidas pueden clasificarse atendiendo a diversos aspectos:

1.1.2.1. Clasificación cronológica

Pesticidas de 1ª generación

- Inorgánicos (Arsénico, etc.)
- Orgánicos vegetales (Nicotina, Piretrinas naturales, Rotenona)
- Orgánicos minerales (Aceites minerales)

Pesticidas de 2ª generación

- Orgánicos sintéticos:
- Clorados (HCH, DDT, Heptacloro, etc.)
- Fosforados (Malatión, Paratión, Monocrotofós, etc.)
- Carbamatos (Carbaril, Carbofuram, etc.)
- Piretroides (Deltametrina, Permetrina, Cipermetrina, etc.)

Pesticidas de 3ª generación

- Microbianos
- Feromonas

Pesticidas de 4ª generación

- Hormonas juveniles (Diflubenzurón, Metroprene, etc.)

Pesticidas de 5ª generación

- Antihormonas:
- Vegetal (Precocenos)
- Microorganismos (Avermectín)

De los pesticidas citados anteriormente los más usados son los organoclorados, fosforados, carbamatos y piretroides [18].

1.1.2.2. Clasificación toxicológica

La extensión de los cultivos y el uso de productos químicos se ha extendido ampliamente para controlar las plagas, lo cual ha influido en un gran desarrollo de pesticidas sintéticos orgánicos, siendo más de mil pesticidas los de uso común [19]. Pero el mismo hecho de su amplia utilización, indiscriminada a veces y asociada a su gran actividad química, ha dado origen a serios problemas de contaminación, por lo que son necesarios medios de control, como por ejemplo la “lucha integrada”, considerada por la FAO como “*el sistema de regulación de las poblaciones de plagas*”

que, teniendo en cuenta el medio ambiente y la dinámica de las poblaciones consideradas, utiliza todas las técnicas y métodos apropiados de la forma más compatible posible, manteniendo las poblaciones de plagas a niveles tales que no causen daños económicos” [20].

La progresión general del desarrollo de los plaguicidas ha variado desde los altamente tóxicos y peligrosos, persistentes y con capacidad de bioacumulación (como el DDT), hacia los plaguicidas que se degradan rápidamente en el medio ambiente y son menos tóxicos para los organismos a los que no van dirigidos, como los piretroides [21].

Sin obviar la importancia de los plaguicidas, tanto en la agricultura como en las actividades de salud pública, son innegables los efectos tóxicos que generan en el ser humano. Su biodisponibilidad en el organismo depende de su toxicocinética: absorción, distribución, metabolismo y eliminación. Estos procesos están influenciados tanto por factores externos relacionados con los patrones de exposición y con las sustancias químicas (tipo de empleo, temperatura ambiental, tipo de plaguicida, frecuencia, intensidad y duración de la exposición, etc.), como por factores inherentes al individuo (edad, sexo, dotación genética, estado de salud, estado nutricional, estilos de vida, vía principal de absorción, etc.) [22].

Las vías de entrada pueden ser varias y simultáneas, siendo las más comunes la vía dérmica, la digestiva y la respiratoria. En el medio laboral la vía dérmica es la más importante, pues a través de ella y en función de la superficie de piel expuesta, se

absorben cantidades significativas de diversos plaguicidas que varían en su nivel de absorción. Ya absorbidos, los plaguicidas liposolubles se difunden a través de los componentes grasos de la piel y la sangre, mientras que los de moléculas hidrosolubles lo hacen a través del material proteico intracelular. En la población general la vía de absorción más importante es el aparato digestivo a partir de la ingestión de alimentos y agua contaminados. La ingestión deliberada o accidental es relativamente poco frecuente. La fineza y delgadez del epitelio alveolar favorece el intercambio de gases en el pulmón; sin embargo, también permite una rápida y eficiente absorción de plaguicidas, que por vía aérea son captados rápidamente hacia el torrente sanguíneo. En el ámbito laboral el uso de fumigantes en forma de gases, polvos, vapores y nebulizaciones, coloca a la vía respiratoria como la segunda en importancia. En la población general la vía aérea es también otra importante ruta de absorción, la frecuente aplicación de plaguicidas en zonas de cultivo por vía aérea, su arrastre por el viento hacia zonas aledañas y el uso común en el hogar de productos en aerosol, nebulizaciones, bombas de humo, etc., favorecen la presencia del producto en el ambiente de forma continua y en pequeñas cantidades. La circulación transplacentaria y la lactancia materna se consideran mecanismos de traspaso más que de absorción, pues muchos plaguicidas o sus metabolitos pasan directamente al nuevo ser a través de la barrera hematoplacentaria y/o durante el proceso de lactancia materna. Los plaguicidas se distribuyen en el organismo a través del torrente sanguíneo. Los compuestos liposolubles se unen a las lipoproteínas, mientras que las moléculas hidrosolubles lo hacen a las proteínas plasmáticas o permanecen disueltas en la sangre. Según su afinidad, el plaguicida se fijará en órganos o tejidos específicos, como

el hígado o los riñones, y aquellos que son lipofílicos se acumularán en tejidos como el adiposo y el nervioso, tal es el caso del DDT.

Hay dos tipos de reacciones por las que los plaguicidas se metabolizan en el organismo: las reacciones de primera fase (oxidación, reducción e hidrólisis), que generalmente son catalizadas por enzimas hepáticas, y las de segunda fase, que son la conjugación y la síntesis. Los metabolitos resultantes de la primera fase son ligados a moléculas endógenas, sintetizándose componentes solubles en agua y fácilmente eliminables por bilis y orina, como los metabolitos hidrosolubles de los piretroides. La biotransformación de los plaguicidas puede dar como resultado sustancias de reducida toxicidad o químicamente inactivas, como ocurre con el metabolito final del dimethoato. Por el contrario, pueden generarse sustancias tóxicamente más activas que el compuesto original, como es el caso del carbosulfán al transformarse en carbofurán, o del paratión que da origen al paraoxón, metabolitos con alta afinidad por el ADN y con capacidad mutágena importante. El cuerpo humano elimina los plaguicidas por tres vías principales: la orina, las heces fecales y el aire exhalado. Algunos productos hidrosolubles, como el lindano y los herbicidas tipo fenoxi, son eliminados fácilmente por vía urinaria sin haber sufrido cambio alguno. La bilis es el medio principal por el que algunos compuestos liposolubles como el DDT y otros organoclorados se eliminan en las heces fecales. Los fumigantes que llegan al cuerpo en forma de gases o vapores son eliminados comúnmente por vía respiratoria, tal es el caso del acrilonitrilo o del bromuro de metilo.

Clasificación según su peligrosidad expresada en DL_{50} (mg/kg)

En 1978, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció una clasificación basada en su peligrosidad o grado de toxicidad aguda, definida ésta como la capacidad del plaguicida de producir un daño agudo a la salud a través de una o múltiples exposiciones, en un período de tiempo relativamente corto. La toxicidad se mide a través de la dosis letal media (DL_{50}). El parámetro varía conforme a múltiples factores como la presentación del producto (sólido, gel, líquido, gas, polvo, etc.), la vía de entrada (oral, dérmica, respiratoria), la temperatura, la dieta, la edad, el sexo, etc..

DL_{50} es la estimación estadística de la cantidad de una sustancia tóxica (mg/kg) por peso corporal, necesaria para matar al 50% de animales de experimentación (usualmente ratas de laboratorio) en los que se ensaya el efecto letal de la sustancia, administrándola por vía oral o dérmica, durante un período de tiempo determinado y seguimiento en un período postexposición. Cuando la exposición a la sustancia tóxica es a través del aire o el agua se le llama CL_{50} y se expresa en $mg L^{-1}$.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica los plaguicidas principalmente en base a su toxicidad aguda en estudios con animales. Los plaguicidas se clasifican en las siguientes clases (tabla 1): extremadamente peligrosos (Ia), altamente peligrosos (Ib), moderadamente peligrosos (II), poco peligrosos (III), normalmente no ofrecen peligro bajo uso normal (IV, a veces no clasificados).

Clasificación Toxicológica de los Plaguicidas				
Clasificación de la OMS según los riesgos	Formulación Líquida DL50 Aguda		Formulación Sólida DL50 Aguda	
	Oral	Dermal	Oral	Dermal
<i>Clase Ia. Productos sumamente Peligrosos</i>	> 20	> 40	> 5	> 10
<i>Clase Ib. Productos Muy Peligrosos</i>	20 a 200	40 a 400	5 a 50	10 a 100
<i>Clase II. Productos Moderadamente Peligrosos</i>	200 a 2000	400 a 4000	50 a 500	10 a 1000
<i>Clase III. Productos Poco Peligrosos</i>	2000 a 3000	> a 4000	500 a 2000	> a 1000
<i>Clase IV. Productos que Normalmente No Ofrecen Peligro</i>	> a 3000		> a 2000	

Tabla 1. Clasificación toxicológica de los pesticidas según la Organización Mundial de la Salud (OMS).

Etiquetado de los plaguicidas

La OMS también establece un sistema de etiquetado por colores para identificar el riesgo o categoría toxicológica de cada pesticida (tabla 2).

Banda de color de las etiquetas según la categoría toxicológica		
Color de la Banda	Clasificación de la OMS según los riesgos	Clasificación del Peligro
Rojo (PS 199C)	Ia- Producto Sumamente Peligroso	MUY TÓXICO
Rojo (PS 199C)	Ib- Producto Muy Peligroso	TÓXICO
Amarillo (PMS Amarillo C)	II- Producto Moderadamente Peligroso	NOCIVO
Azul (PMS 293 C)	Producto Poco Peligroso	CUIDADO
Verde (PMS 347 C)	IV- Producto que normalmente no Ofrece Peligro	CUIDADO

Tabla 2. Etiquetado de los plaguicidas según la categoría toxicológica (OMS).

La etiqueta presente en el envase consta de tres partes:

1. Área de información de riesgos.
2. Área de información fitoterapéutica o de utilización.

3. Área de información principal, donde además debe constar de la siguiente información:

- Nombre comercial o denominación del producto.
- Nombre y dirección del titular de la inscripción en el Registro de Plaguicidas; responsable de su puesta en el mercado.
- Número de inscripción en el Registro de Plaguicidas de uso Ambiental del Ministerio de Sanidad.
- Nombres comunes, y contenidos respectivos, de los ingredientes activos, expresados en porcentaje en peso para los plaguicidas sólidos, aerosoles, líquidos volátiles y viscosos. En porcentaje en peso y gramos por litro a 20°C para los demás plaguicidas líquidos. En porcentaje en volumen para los gases.
- Nombre de todas las sustancias muy tóxicas, tóxicas, nocivas y corrosivas que no sean ingredientes activos.
- Cantidad neta de plaguicida contenida en el envase.
- Número de referencia del lote de fabricación y fecha de fabricación, junto a plazo límite de comercialización si el plaguicida solo fuese estable por 2 años.

1.1.2.3. Clasificación según su vida media de efectividad

- No persistente: de días hasta 12 semanas (malatión, diazinón, carbarilo, diametrín).

- Moderadamente persistente: de 1 a 18 meses (paratión, lannate).
- Persistente: de varios meses a 20 años (DDT, aldrín, dieldrín).
- Permanente: Indefinidamente (productos hechos a partir de mercurio, plomo, arsénico).

1.1.2.4. Clasificación según el destino de su aplicación

- Pesticidas de uso fitosanitario, productos fitosanitarios destinados a su utilización en el ámbito de la sanidad vegetal o el control de vegetales.
- Pesticidas de uso ganadero: destinados a su utilización en el entorno de los animales o en actividades relacionadas con su explotación.
- Pesticidas de uso en la industria alimentaria: destinados a tratamientos de productos o dispositivos relacionados con la industria alimentaria.
- Pesticidas de uso ambiental: destinados al saneamiento de locales o establecimientos públicos o privados.
- Pesticidas de uso en higiene personal: preparados útiles para la aplicación directa sobre el ser humano.
- Pesticidas de uso doméstico: preparados destinados para aplicación por personas no especialmente calificadas en viviendas o locales habitados; es el más peligroso, ya que alrededor de 10 millones de personas mueren a causa de vectores.

1.1.2.5. Clasificación según acción específica

Los pesticidas también se pueden clasificar según la acción que realicen o a que van dirigidos. En la siguiente tabla 3 se especifican algunos de ellos.

Acción	Control
Insecticida	Insectos.
Acaricida	Acaros.
Fungicidas	Hongos.
Nematocida	Nematodos.
Desinfectante	Destruye o inactiva microorganismos.
Bactericida	Bacterias.
Herbicida	Malas hierbas.
Fitorregulador	Regulación del crecimiento.
Rodenticida	Roedores.
Helminticida	Caracoles.
Ovicidas	Destruye huevos.
Termiticidas	Termitas.
Repelentes	Repele insectos ácaros o vertebrados.
Quimioesterilizantes	Esteriliza insectos o vertebrados.
Algicidas	Algas.
Desecantes	Acelera desecación de plantas.
Larvicidas	Control de larvas.

Tabla 3. Acción específica de pesticidas.

1.1.2.6 Clasificación según su estructura química

Desde el punto de vista de su constitución química, los pesticidas pueden clasificarse en diversos grupos, siendo los más importantes los siguientes [23]:

Carbamatos

Son compuestos orgánicos derivados del ácido carbámico (NH₂COOH). Comprende tanto los carbamatos como los ésteres de carbamatos y los ácidos carbámicos, en la figura 3 se muestra la estructura molecular del aldicarb:

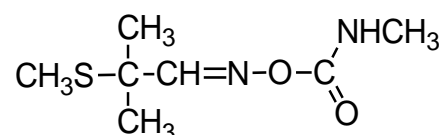


Figura 3. Estructura molecular del aldicarb.

Dentro del grupo de los carbamatos se encuentran los tiocarbamatos y los ditiocarbamatos, en los que se ha sustituido el oxígeno por azufre; éstos tienen actividad fungicida. Aunque muchos son insecticidas tienen una importante acción herbicida generalmente selectiva. Destruyen las hierbas de hoja estrecha en cultivos de hoja ancha. Se absorben en las hojas y actúan también en el suelo, cuando son arrastrados por el agua de lluvia o riego hasta la zona de las raíces. Son más eficaces durante la germinación cuando la división celular es más activa.

Se hidrolizan fácilmente en medio alcalino y por acción de la luz y el calor. Poseen la capacidad de inhibir reversiblemente las enzimas colinesterásicas, por ello su acción insecticida y herbicida.

Sus características principales son su alta toxicidad, su baja estabilidad química y su nula acumulación en tejidos.

Derivados de la urea

Los derivados de la urea (NH_2CONH_2), muestran una actividad herbicida muy marcada. En esta familia de herbicidas se pueden distinguir dos grupos distintos de compuestos, las fenilureas, como el linurón y el diurón, y las sulfonilureas, entre las que se encuentran el bensulfurón y el metsulfurón metil (figura 4).

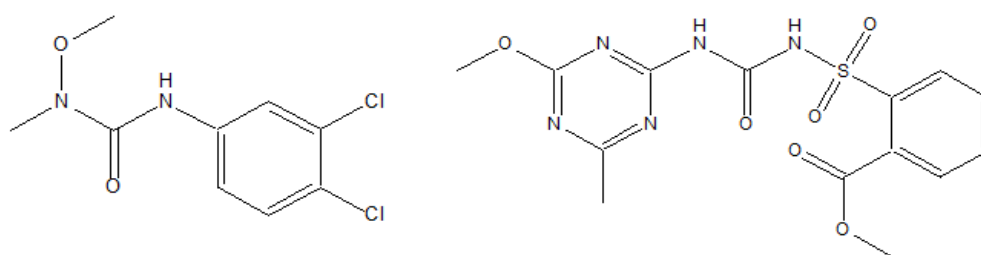


Figura 4. Estructura molecular del linurón y metsulfurón metil.

Las fenilureas se descubrieron primero y se han utilizado ampliamente, pero en la actualidad se emplean más las sulfonilureas por presentar una actividad herbicida muy superior a la de las fenilureas, por lo que se necesitan dosis mucho más bajas y, por tanto, dan lugar a unos niveles de residuos más bajos. En la figura 5 se muestra la estructura molecular del isoproturón.

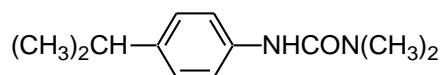


Figura 5. Estructura molecular del isoproturón.

Los compuestos de este grupo se usan principalmente como esterilizantes en terrenos donde se quiere evitar el crecimiento de todas las plantas y en tratamientos de preemergencia.

Actúan inhibiendo la reacción de Hill, y por tanto, impidiendo el proceso normal de fotosíntesis.

Organoclorados

Esta familia hace referencia a un amplio grupo de compuestos químicos orgánicos que contienen cloro, además de otros elementos químicos.

Desde el punto de vista estructural, constituyen un grupo de sustancias muy heterogéneo, teniendo en común la presencia de estructuras monocíclicas o policíclicas con distinto número de sustituyentes.

Poseen una alta actividad insecticida debido al cloro que contienen en su molécula.

Los compuestos orgánicos halogenados fueron los primeros productos sintéticos usados como pesticidas. El DDT (sintetizado en 1874) exhibía un espectro de actividad insecticida, lo que propició el desarrollo de muchos otros compuestos orgánicos sintéticos clorados (figura 6).

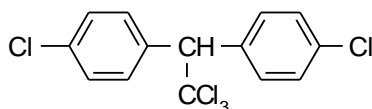


Figura 6. Estructura molecular del DDT.

La actividad herbicida de estos compuestos aumenta notablemente con la presencia de átomos de halógeno en la molécula, la máxima fitotoxicidad se da cuando hay dos átomos de cloro unidos a un núcleo aromático.

Tienen una importante persistencia no sólo en el suelo sino también a nivel de los tejidos humanos. Numerosos compuestos representativos de esta categoría están prohibidos debido a su neurotoxicidad.

Organofosforados

Sus estructuras químicas derivan de la sustitución por restos orgánicos en el fósforo pentavalente. Pueden clasificarse como:

- *Derivados de la molécula de ácido fosfórico* (figura 7). Si los dos primeros oxhidrilos se esterifican con radicales alquílicos se obtienen los alquil-fosfatos o alquil-pirofosfatos (ej. diclorvos). Si dichos oxhidrilos se sustituyen por amidas se obtienen las fosforamidas (ej. metamidofos).

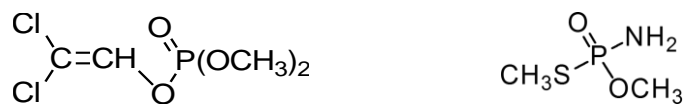


Figura 7. Estructura molecular del diclorvos y metamidofos.

- *Derivados de la molécula del ácido fosfortiónico*. De este ácido derivaran a su vez numerosos tiofosfóricos (ej. paratión (figura 8)).

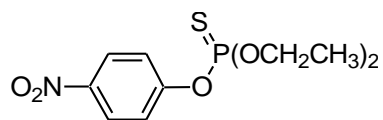


Figura 8. Estructura molecular del paratión.

- *Derivados del ácido fosfortiólico*. (ej. malatión (figura 9)).

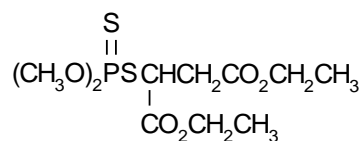


Figura 9. Estructura molecular del malatión.

Estos compuestos hacen referencia a un grupo de insecticidas que actúan sobre la enzima acetilcolinesterasa (el grupo de pesticidas de los carbamatos también actúa sobre esta enzima pero a través de un mecanismo diferente). Estos pesticidas inactivan irreversiblemente la acetilcolinesterasa, esencial para el sistema nervioso en humanos, insectos y otros animales. Los pesticidas organofosforados presentan una variación enorme en su capacidad para afectar a esta enzima y de este modo en su potencial de envenenamiento. Por ejemplo, el paratión, uno de los primeros organofosforados descubiertos, es en muchas ocasiones más potente que el malatión, un insecticida usado para combatir la mosca de la fruta Mediterránea y el Virus del Nilo del Oeste transmitido por los mosquitos. Los pesticidas organofosforados tienden a degradarse rápidamente cuando se exponen a la luz, el aire y el suelo aunque pequeñas cantidades pueden persistir y terminar en la comida y en el agua potable. Su capacidad de degradación hace de estos compuestos una interesante alternativa para los persistentes pesticidas organoclorados. Mientras que los pesticidas organofosforados se degradan más rápido que los organoclorados, éstos tienen una toxicidad mucho más aguda planteando riesgos para los agricultores, los aplicadores de pesticidas y cualquiera que se exponga a cantidades importantes de estos compuestos. Son los insecticidas, junto con los carbamatos y piretroides, más ampliamente utilizados en la actualidad.

Piretroides

Son compuestos derivados del ácido crisantémico, cuyo éster cetoalcohólico le proporciona propiedades insecticidas [24]. Son muy efectivos para un gran número de plagas y muestran una toxicidad muy selectiva para insectos, siendo poco tóxicos para los mamíferos y las aves [25-26]. Mantienen abiertos los canales de sodio de las membranas neuronales, despolarizándolas e impidiendo su correcto funcionamiento.

Su estructura general química se muestra en la figura 10; los piretroides sintéticos son más estables que los naturales debido a que contienen alcoholes en su molécula.

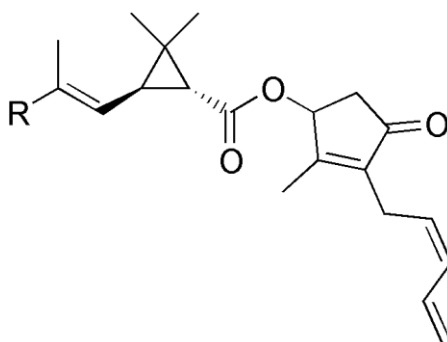


Figura 10. Estructura general de las piretrinas.

Triazinas

Las triazinas constituyen una de las familias más antiguas de herbicidas empleados en la agricultura, en especial la atrazina y la simazina (figura 11).

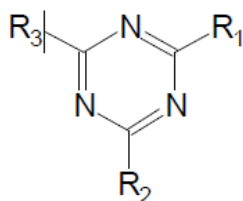


Figura 11. Estructura general de las triazinas.

Se clasifican de acuerdo con los sustituyentes que posean, en:

- Derivados con átomos de cloro y otro sustituyente, son muy inestables, tienen poco interés práctico.
- Derivados con un átomo de cloro y otros dos sustituyentes.
- Derivados sin cloro en su molécula.

Esta familia de compuestos tiene un amplio abanico de usos. La mayoría son utilizados en programas de control selectivos para malas hierbas. Como herbicidas, las triazinas pueden ser usadas solas o en combinación con otros ingredientes activos para incrementar el espectro de control de las malas hierbas. Las plantas resistentes son capaces de metabolizar los ingredientes activos mientras que las plantas susceptibles no.

Estos compuestos penetran a través de la cutícula de las hojas y se mueven hacia la punta de las mismas; también se absorben a través de las raíces y circulan por el xilema hacia la parte superior de la planta, acumulándose, en todos los casos, en los

bordes de las hojas. La acción fundamental, en las células de las hojas, es el bloqueo de la fotosíntesis.

La mayoría son poco solubles en agua, lo cual favorece su persistencia. En el suelo su movilidad es pequeña, tanto por su escasa solubilidad con su fijación a las arcillas.

En condiciones normales de almacenamiento son estables; pero por lo general se hidrolizan en medio alcalino o ácido, especialmente cuando se eleva la temperatura.

Derivados bipyridilos

Son compuestos de amonio cuaternario, muy peligrosos y tóxicos. Los bipyridilos son herbicidas sólidos, insípidos e inodoros y muy solubles en agua.

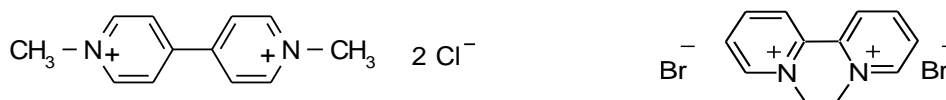


Figura 12. Estructura química del paraquat y diquat, respectivamente.

Dentro de este grupo se consideran el paraquat y el diquat (figura 12). En su forma líquida, el paraquat se utiliza como herbicida de contacto para destruir las partes verdes de las plantas en presencia de la luz solar. El uso más frecuente del diquat es como herbicida acuático.

Su modo de acción es la generación de radicales superóxido que provoca daño en la membrana celular por la peroxidación de lípidos.

Derivados del ácido fenoxiacético

Estos herbicidas se introdujeron a mediados de los años cuarenta con el descubrimiento en 1942 del 2,4-D derivado del ácido fenoxiacético y son los más extensamente usados a nivel mundial. Este tipo de plaguicidas presenta una fuerte actividad herbicida por lo que se pueden emplear a dosis muy bajas con una gran selectividad. En la figura 13, se muestran dos de los compuestos más importantes de este grupo.

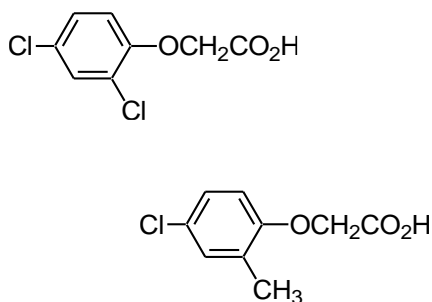


Figura 13. Estructura química del 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) y del MCPA (ácido 2-metil-4-clorofenoxiacético, respectivamente).

Compuestos de origen botánico

A principios del pasado siglo, los plaguicidas consistían fundamentalmente en sales metálicas y productos naturales extraídos de plantas como la quasia, la nicotina, la rotenona y las piretrinas.

La Comunidad Económica Europea, la Agencia para la Protección del Ambiente de los Estados Unidos de Norteamérica (EPA) y la FAO, remarcan que las diferencias fundamentales con los plaguicidas químicos convencionales consisten en su singular modo de acción, que no es por la vía de toxicidad directa, sino la pequeña

concentración en el material vegetal y su especificidad para la especie a combatir, y se dividen en general en dos grandes grupos: agentes o plaguicidas microbianos, que incluyen las bacterias, hongos, virus y protozoos, y agentes o plaguicidas bioquímicos, que comprenden los atrayentes, hormonas, reguladores del crecimiento de plantas e insectos, enzimas y sustancias de señalización química también llamadas semiquímicos, muy importantes en la relación planta-insecto. Junto con las reacciones del metabolismo primario que son similares en todos los organismos, existe en las plantas un número de pasos metabólicos que conducen a la formación de productos secundarios. La procedencia de los plaguicidas naturales de origen botánico se debe precisamente a la síntesis o acumulación de estos productos del metabolismo secundario que tienen las siguientes características:

- No son esenciales al metabolismo.
- Están en relación con otro organismo, o sea, pueden actuar como medios de defensa.
- Son característicos de especies o familias.
- Son metabólicamente costosos para la planta.
- Son tóxicos para animales y plantas, actuando como repelentes, alomonas, y reguladores del crecimiento.
- Están presentes en etapas fenológicas de la planta y se acumulan en determinados órganos.
- Se encuentran en mayor cantidad en las plantas perennes.

Existen muchas estructuras diferentes de metabolitos secundarios, que superan bastante las de los primarios. Entre los más comunes podemos citar:

Fenoles: Son compuestos hidroxilados que pueden actuar como antialimentarios; otros como los taninos actúan como barrera por su sabor amargo, y las cumarinas inhiben el crecimiento de hongos y son tóxicas para nematodos, ácaros e insectos.

Terpenos: Son los principales constituyentes de los aceites esenciales y actúan como repelentes e inhibidores de la alimentación y la oviposición.

Glicósidos cianogénicos: Al hidrolizarse liberan cianuro, por lo que son tóxicos y repelentes.

Compuestos azufrados: Entre los más importantes están los tiofenos, con acción insecticida y nematicida.

Flavonoides: Son los compuestos que dan color a plantas y flores, a ellos pertenece la rotenona, y actúan como inhibidores enzimáticos y repelentes.

Alcaloides: Son el grupo más diverso de metabolitos secundarios, con muy variados efectos tóxicos; a ellos pertenece la nicotina [27].

Los pesticidas más utilizados son los organoclorados, piretroides, organofosforados y carbamatos. De entre ellos, los insecticidas, funguicidas y herbicidas copan el 95% del mercado de la UE, con una distribución en función del destino de aplicación (figura 14).

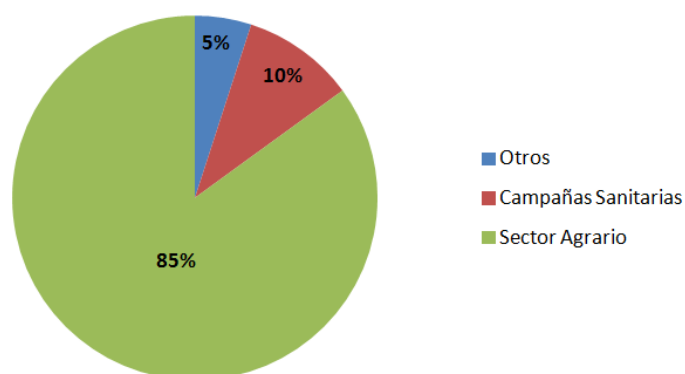


Figura 14. Distribución del consumo de pesticidas en función del destino de aplicación (AEPLA).

1.1.3. Efecto de los plaguicidas sobre el medioambiente y la salud humana

La progresión general del desarrollo de los plaguicidas ha variado desde los altamente tóxicos y peligrosos, persistentes y con capacidad de bioacumulación (como el DDT), hacia los plaguicidas que se degradan rápidamente en el medio ambiente y son menos tóxicos para los organismos a los que no van dirigidos [28].

A pesar de que los pesticidas han sido diseñados para ofrecer una alta especificidad de acción, su uso genera innumerables efectos secundarios como la generación de organismos resistentes, persistencia en el medioambiente o la contaminación de los recursos hídricos. Los pesticidas organoclorados son un ejemplo de persistencia ambiental, ya que algunos de ellos permanecen en los suelos sin degradación significativa hasta 30 años después de ser aplicados (DDT). Esa permanencia favorece su incorporación a las cadenas tróficas, la biomagnificación y la acumulación en los tejidos grasos de humanos y animales. Asimismo, la aplicación sistemática de plaguicidas altera los equilibrios existentes en las cadenas tróficas normales al causar la desaparición o disminución de los enemigos naturales de

distintas plagas, de descomponedores de materia orgánica, de incorporadores de nitrógeno y de otras especies vitales para mantener los ciclos biológicos, como por ejemplo los insectos polinizadores. Estos factores mencionados anteriormente forman un ciclo cerrado de distribución de plaguicidas, que se retroalimenta y refuerza, provocando multitud de efectos malignos para el medioambiente (figura 15) [18].

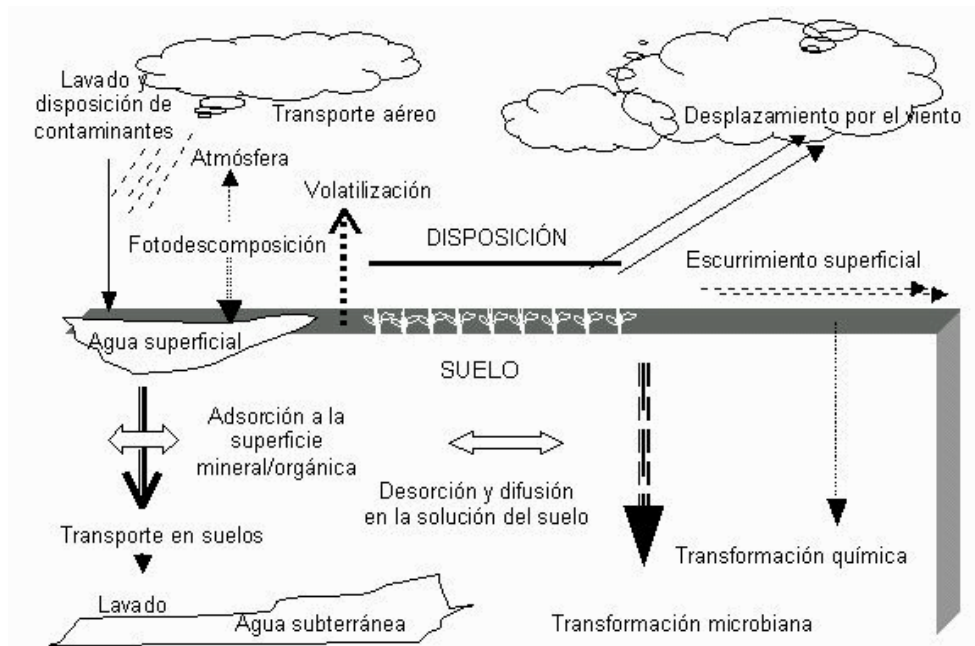


Figura 15. Mecanismos de distribución de los pesticidas.
 (<http://edafologia.ugv.es/conta/tema13/factor.htm>)

Los pesticidas pueden ser transformados en el medio ambiente, cultivos, animales y seres humanos en un gran número de productos de degradación, generalmente definido como productos de transformación. En la actualidad existe una creciente preocupación con respecto a la formación de estos productos de transformación, ya que hay evidencias que indican que estos productos pueden ser mas tóxicos, y persistentes que los compuestos originales [29]. Los productos de transformación

pueden tener diferentes propiedades que les permiten acceder a áreas del medio ambiente que no llega el mismo pesticida. [30].

Las transformaciones sufridas por los pesticidas pueden ser biológicas, (metabolismo) o químicas, y pueden ocurrir a través de reacciones como la hidrólisis (reacción con el agua), la fotólisis (rotura por la luz solar), la oxidación y/o reducción. Por ejemplo, la fotodegradación es uno de los factores mas importantes que participan en la descomposición de los pesticidas y depende de las condiciones climáticas, la presencia de fotosensibilizadores, etc. [29].

Debido al uso intensivo de plaguicidas, a su toxicidad y a su capacidad de acumulación en el cuerpo humana, es preciso tener un control en los niveles de concentración de estos compuestos, tanto en matrices biológicas (alimentos, tejidos animales, tejidos vegetales), como en mediambientales (agua,suelo, aire). Este control debe afectar tanto a los restos de plaguicidas, como a sus metabolitos y productos de degradación o de reacción, que estén presentes en la matriz de estudio.

Además, el numero de pesticidas usados en la actualidad es muy alto (cerca de 800 compuestos se aplican a los cultivos agrícolas) [31] y su composición química muy variada, por lo que los efectos tóxicos y los problemas medioambientales derivados de su amplia utilización son complejos y muy variados. La toxicidad de los plaguicidas presentes en el medio ambiente obliga a disponer de métodos analíticos fiables, rápidos, económicos y suficientemente sensibles que permitan el control de estos compuestos tóxicos. No es de extrañar, por lo tanto, que desde las últimas décadas del

siglo XX se hayan empezado a desarrollar cada vez mas métodos con el fin de determinar los niveles de plaguicidas en muestras ambientales.

1.1.4. Legislación aplicable a pesticidas

La normativa sobre los niveles máximos de residuos se inició en Europa en los años 60 y 70, y ha sufrido numerosas modificaciones posteriores. En España, la primera lista de LMRs (Límites Máximos de Residuos) se promulgó en 1979.

La legislación europea sobre residuos de plaguicidas está contenida básicamente en el Reglamento 396/2005 y en los reglamentos que lo complementan en sus anexos, principalmente el Reglamento 178/2006 sobre los productos vegetales a los que se aplican los LMR, los Reglamentos 149/2008 y 839/2008 donde se fijan los LMR y Reglamento 915/2010 de la Comisión, de 12 de octubre de 2010, relativo a un programa plurianual coordinado de control de la Unión para 2011, 2012 y 2013 destinado a garantizar el respeto de los límites máximos de residuos de plaguicidas en los alimentos de origen vegetal y animal o sobre los mismos y a evaluar el grado de exposición de los consumidores a estos residuos [Diario Oficial L 269 de 13.10.2010]..

De hecho, los residuos de DDT, a pesar de encontrarse prohibido su empleo desde los 70, se encuentran presentes hoy día en suelos, aguas, etc. La legislación contempla estos hechos adjudicando LMRs al nivel de detección analítica para aquellos plaguicidas prohibidos y, por otro lado, fijándolos para el resto de plaguicidas organoclorados en valores en torno a 50 ng/g, en la mayor parte de los casos.

En cuanto a los piretroides, es éste un grupo de creación mucho más reciente (años 70-80). Aparecen como los derivados sintéticos de las piretrinas, insecticidas naturales de origen vegetal bastante caros. Estos plaguicidas son ya menos tóxicos que los organoclorados gracias, principalmente, a su menor persistencia. Cabría esperar, por tanto, que sus LMRs fuesen más elevados y, aunque superiores que para la mayoría de los plaguicidas organoclorados, tampoco lo son de manera excesiva. De hecho, sus LMRs se sitúan entre 100 y 500 ng/g. Esto se debe a que, como ya ha sido comentado, los LMRs no se fijan teniendo en cuenta únicamente los criterios toxicológicos de los plaguicidas, sino también los agrícolas. Así, y puesto que son poco persistentes, tras efectuar los tratamientos bajo las normas de las Buenas Prácticas Agrícolas, la presencia de residuos en los productos ha de ser mínima. Aunque la práctica totalidad de los plaguicidas piretroides tienen su utilización permitida debido a sus características, no por ello los órganos de vigilancia de la UE (y otros organismos) dejan de tenerlos en cuenta en sus evaluaciones periódicas. De hecho, el empleo de fenvalerato se está cuestionando y es por ello que su LMR ha sido reducido en poco tiempo, hallándose actualmente fijado en el límite de determinación analítica (0.02 ng g^{-1}).

En lo referente a las aguas de consumo público, la legislación europea (*Directiva Comunitaria 80/778/CEE*, DO L 229, Comunidad Europea, Bruselas, 1980.) y la española (Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano.), fijan la presencia de residuos con un único LMR establecido para plaguicidas de forma individual e

independientemente del compuesto que se trate, con un valor de 0.1 microgramos por litro de muestra acuosa. A su vez, también establece otro LMR para la cantidad global de plaguicidas presentes, es decir, la suma de las diferentes cantidades de plaguicidas presentes en la muestra acuosa y, que en este caso, está fijado en 0.5 microgramos por litro de muestra acuosa.

1.1.5. Determinación de pesticidas

Los plaguicidas suelen encontrarse a niveles traza en multitud de muestras, tanto biológicas como medioambientales, por lo que se requiere metodologías muy sensibles y selectivas para su determinación. El proceso de análisis es a menudo complicado y consta de varias etapas, siendo generalmente la última de ellas una determinación cromatográfica, gaseosa o líquida, con un detector adecuado. La efectividad de este análisis no depende únicamente del instrumento cromatográfico de medida, sino que es el resultado de todas las operaciones intermedias a las que se somete la muestra. El esquema general de las etapas intermedias en un proceso analítico se basa en:

- Almacenamiento y conservación de la muestra.
- Pretratamiento de la muestra.
- Extracción del analito de la muestra.
- Purificación del extracto.
- Preconcentración.
- Medida analítica.

Debido a la variedad de clases de pesticidas y sus propiedades químicas es difícil el desarrollo de metodologías que abarcan todos los analitos en estudio. La mayoría de los métodos requieren mucho tiempo y el uso de grandes cantidades de disolventes orgánicos. Recientes desarrollos analíticos han centrado sus estudios en minimizar el número de manipulaciones físicas y químicas, el volumen de disolventes, el uso de solventes tóxicos, y se han dirigido a automatizar la extracción y limpieza de los procedimientos en la medida de lo posible.

- *Purificación de extractos (Clean-up)*

La determinación de contaminantes orgánicos, presentes en niveles traza (del orden de $\mu\text{g kg}^{-1}$) en muestras medioambientales o alimentos, requiere de un proceso de purificación o limpieza del extracto con el que se consiga separar los analitos a determinar de las especies interferentes y que además se obtenga una recuperación cuantitativa de todos ellos. Las especies interferentes presentes en este tipo de muestras son generalmente compuestos de elevado peso molecular, como lípidos, polímeros o pigmentos, que imposibilitan la posterior determinación cromatográfica (tanto por GC como por HPLC). Las metodologías más frecuentemente empleadas para la limpieza de extractos cromatográficos son: extracción líquido-líquido, extracción en fase sólida y cromatografía de permeación en gel.

- *Extracción líquido-líquido*

Este procedimiento, también denominado *partición con disolventes*, se emplea comúnmente en la limpieza de extractos. La partición con hexano-acetonitrilo es uno

de los métodos más empleados para la eliminación de grasas o aceites de extractos con alto contenido lipídico. El procedimiento es muy simple y consiste en disolver este extracto graso en hexano, que se extrae repetidas veces con acetonitrilo, estos disolventes son inmiscibles y forman dos fases bien separadas. Además el acetonitrilo es un mal disolvente para las grasas, pero sin embargo disuelve, con mayor avidez que el hexano, una gran variedad de contaminantes orgánicos y multitud de pesticidas.

Esta metodología sola o combinada con otra técnica es comúnmente empleada en multitud de procedimientos, como por ejemplo: en la determinación de multiresiduos de pesticidas en aceite oliva se emplea una partición con acetonitrilo-hexano para extraer estos compuestos de la matriz [32].

- *Extracción en fase sólida*

Las fases sólidas más empleadas para realizar la extracción en fase sólida, son generalmente adsorbentes inorgánicos polares, como: gel de sílice, alúmina o florisil (gel de sílice de magnesio). Estos soportes retienen muy fuertemente los compuestos orgánicos hidrofílicos y en menor medida los compuestos hidrofóbicos. El proceso de elución se realiza con un disolvente hidrofóbico, como por ejemplo hexano, al que se van añadiendo pequeñas cantidades de modificador, que suele ser un disolvente más hidrofílico, produciéndose una separación paulatina de los compuestos según su hidrofobicidad. También se pueden emplean soportes hidrofóbicos como carbón grafitizado o fases orgánicas unidas a sílice como la C18, donde se retienen los compuestos muy lipofílicos eluyéndose el resto.

Generalmente las fases sólidas polares (sílice, alúmina y florisil) requieren de un proceso de activación, en el que empleando temperaturas de 300-350 °C se eliminan las moléculas de agua que bloquean los puntos polares activos del soporte sólido. Esta activación mejora considerablemente la reproducibilidad ya que de esta forma siempre hay el mismo número de puntos activos por gramo de soporte, sin depender de la humedad que haya podido captar del medio.

Cuando se emplea alúmina, además de la activación a elevada temperatura, también se requiere de una desactivación del soporte, que se consigue añadiendo pequeñas cantidades de agua, para bloquear de una forma controlada el número de puntos activos de la alúmina y de esta forma ajustar la capacidad de retención del soporte a nuestro analito.

El empleo de la extracción en fase sólida como método para realizar la limpieza de extractos cromatográficos está ampliamente extendido para la determinación de multitud de analitos en matrices de distinta índole. Algunos ejemplos del uso de extracción en fase sólida en el análisis de plaguicidas son: la determinación de endosulfán y derivados en suelos, tras una extracción en fase sólida, se emplea un tratamiento con florisil para limpiar el extracto [33]; la determinación de 21 plaguicidas por extracción asistida por microondas en suelos, el extracto se purifica empleando fases de florisil y alúmina como adsorbente [34]; la determinación de organofosforados en tejidos animales, tras una partición con disolventes se limpia el extracto con un cartucho de C18 [35]; y la determinación de piretroides en mantequilla y aceites vegetales, usando cartuchos de carbón grafitizado [36].

- *Cromatografía de permeación en gel*

Esta técnica fue inicialmente desarrollada para determinar la distribución de pesos moleculares de polímeros y consiste en la separación de los distintos compuestos de una mezcla por tamaño, mediante un proceso de partición entrópica en una matriz porosa.

La técnica consiste en una cromatografía líquida convencional que emplea columnas de un material macroporoso, generalmente de copolímero poliestireno-divinilbenceno, que es mecánicamente fuerte y puede soportar presiones y flujos elevados [37]. Como fase móvil es muy común el empleo de diclorometano o tetrahidrofurano, pero debido a su peligrosidad tanto para el operador como para el medio ambiente, se suele sustituir por alcanos, tanto cíclicos como lineales. El uso de modificadores como metanol, acetato de etilo o metil tert-butil éter es frecuente para ajustar las condiciones de elución [38].

Esta metodología se considera universal, debido a que se puede emplear en todo tipo de muestras y analitos, ya que la separación se produce única y exclusivamente por interacciones físicas [39].

Esta metodología se utiliza en el análisis de pesticidas, como por ejemplo en análisis de multiresiduos de pesticidas en aceite de oliva [40] o en tejidos animales [41].

A menudo una simple limpieza de extractos por cromatografía de permeación en gel, no es suficiente para eliminar completamente los residuos de grasa, por ello se

suele combinar con otro sistema de separación como extracción en fase sólida, para que la separación de los compuestos se produzca por dos fenómenos primero por tamaño y después por polaridad, como por ejemplo la limpieza de extractos de vegetales con una mini columna de Florisil y sílice para determinar pesticidas nitrogenados y fosforados [42].

1.1.5.1. Técnicas analíticas utilizadas en el análisis de pesticidas

Son muchas las técnicas utilizadas en el análisis de pesticidas, la figura 16 muestra las técnicas más utilizadas y el número de trabajos realizados; como se observa la técnica con mayor número de trabajos actualmente es la espectrometría de masas. Cabe destacar que esta técnica es muy utilizada acoplada a otras como cromatografía de gases, HPLC o electroforesis capilar.

La cromatografía de gases (GC) es la técnica más ampliamente empleada para el análisis multiresidual de pesticidas sobre todo de los volátiles [43], siendo capaz de conseguir límites de detección muy bajos ($\mu\text{g L}^{-1}$ – ng L^{-1}). Muchos métodos oficiales de análisis están basados en esta técnica.

Para el análisis de compuestos de alto peso molecular, altamente polares o térmicamente lábiles, se emplea la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), que ha ido ganando terreno especialmente con el acoplamiento a un espectrómetro de masas.

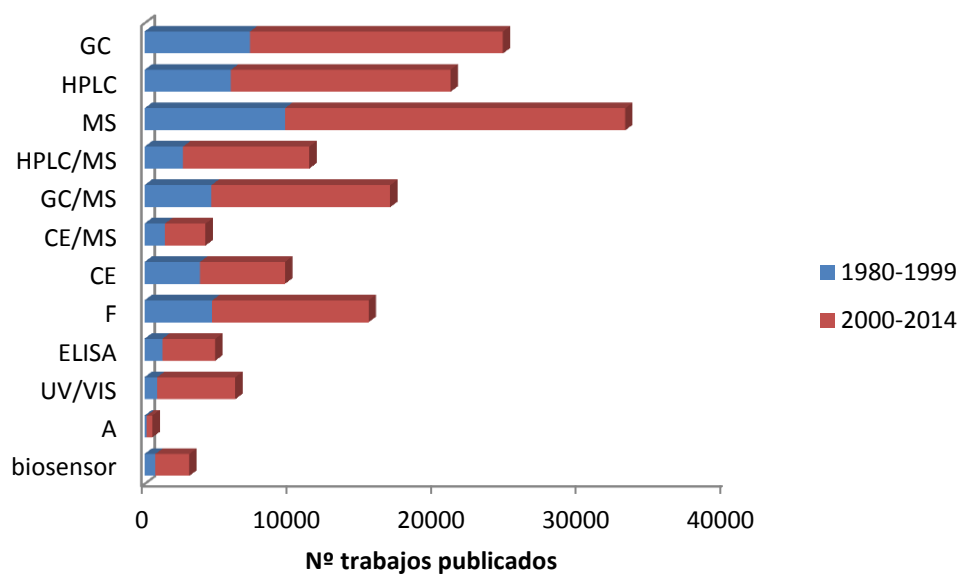


Figura 16. Número de trabajos publicados según la técnica de detección de pesticidas. (Web of Science)

En la cromatografía de gases, inicialmente, se emplearon columnas empaquetadas con fases estacionarias como las metil siliconas, metil-fenil siliconas y cloropropil siliconas. En los últimos años, predomina claramente la utilización de columnas capilares, ya que presentan una mayor sensibilidad y resolución que las empaquetadas y, por tanto, permiten conseguir mejores límites de detección.

Durante el desarrollo de la cromatografía de gases se han utilizado diferentes detectores en el análisis de trazas de pesticidas. El detector de captura de electrones (ECD, *electron capture detector*) es muy sensible a los compuestos que contienen grupos funcionales electronegativos tales como halógenos, grupos nitro, dobles enlaces y quinonas; en cambio no es sensible a grupos funcionales como aminas y alcoholes. El detector de nitrógeno-fósforo (NPD, *nitrogenphosphorus detector*), también conocido como detector termoiónico (TID, *thermoionic ionization detector*),

se emplea en el análisis de pesticidas que posean átomos de nitrógeno o fósforo, como es el caso de las triazinas y de los insecticidas organofosforados [44].

En los últimos años, la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (GC-MS, *gas chromatography-mass spectrometry*) se ha implantado en la determinación de pesticidas. Tanto es así, que en la Unión Europea es un requisito que la espectrometría de masas sea la técnica empleada para la confirmación de residuos de pesticidas en alimentos de origen animal en los laboratorios autorizados para el control oficial de residuos, según la Decisión de la Comisión 2002/657/CE. Con esta técnica se puede detectar la masa característica de un compuesto y seleccionando dicha masa, puede detectarse selectivamente ese compuesto de interés en una matriz compleja. De esta manera se pueden determinar e identificar residuos de pesticidas a niveles de concentración muy bajos. La adquisición de datos se puede llevar a cabo de dos modos distintos, cuando se trabaja en el modo de barrido (scan), se detecta un intervalo de masas, mientras que si se trabaja en el modo SIM (*selected ion monitoring*) solamente se consideran las masas características de los compuestos de interés, lo que incrementa la sensibilidad entre 5 y 100 veces cuando se trabaja de este modo, ya que aumenta el tiempo de medida. Las partes fundamentales de un espectrómetro de masas son la fuente de ionización que genera los iones en fase gaseosa y el analizador de masas donde estos iones se separan en función de su relación masa/carga. Existen tres tipos de fuentes de ionización: el impacto electrónico (EI, *electron impact*), la ionización química positiva y la ionización química negativa, siendo la primera la más utilizada ya que se genera un gran número de fragmentos

característicos y existen bases de datos, que se pueden consultar, con los espectros de masas de multitud de compuestos.

En la actualidad también se está empleando la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas en tándem (GC/MS-MS), donde se acopla un espectrómetro de masas a otro, una técnica mucho más sensible y selectiva que la anterior. En el primer espectrómetro, equipado con una fuente de ionización que dé lugar a poca fragmentación, como es la ionización química, se aíslan los iones moleculares o los iones moleculares protonados de los distintos componentes de una mezcla. En el segundo espectrómetro estos iones son fragmentados para dar una serie de espectros de masa, uno por cada uno de los iones moleculares obtenidos en el primer espectrómetro, consiguiendo de esta manera una selectividad y sensibilidad elevadas.

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), es una técnica que se emplea para el análisis de pesticidas polares o térmicamente lábiles que no pueden analizarse directamente por cromatografía de gases. La preparación de derivados térmicamente estables para el análisis por GC supone un incremento en el tiempo de análisis y puede originar pérdidas de los pesticidas objeto de estudio, por lo que la cromatografía de líquidos es una alternativa para este tipo de compuestos. La mayoría de los métodos HPLC desarrollados para el análisis de pesticidas son de fase inversa, con columnas rellenas de una fase estacionaria apolar como la C8 o C18, mientras que la fase móvil es relativamente polar. El detector más utilizado en HPLC es el ultravioleta de longitud de onda fija (UV) o variable (detector de diodos en fila, DAD). El detector de

fluorescencia también se emplea en el análisis de pesticidas, pero estos deben tener algún grupo fluoróforo o es necesario generar un derivado fluorescente. El detector UV, aunque se puede utilizar para la mayoría de los pesticidas, presenta el inconveniente de su baja sensibilidad y selectividad, por lo que cada vez es más habitual la detección por espectrometría de masas. La cromatografía de líquidos acoplada a la espectrometría de masas (HPLC-MS) presenta la ventaja de analizar los pesticidas sin la necesidad de derivatizar los compuestos para aumentar su sensibilidad, a la vez que se obtiene información estructural que permite su identificación. Al igual que en GC-MS, se utiliza el modo SIM y MS-MS para aumentar la sensibilidad y la selectividad. La cromatografía de líquidos a temperaturas elevadas empleando agua pura como fase móvil es una variante de la cromatografía de líquidos que ha ganado popularidad en los últimos años [45]. A diferencia de la cromatografía de líquidos convencional, el incremento de la fuerza eluyente se debe al aumento de temperatura de la fase móvil en vez de por la presencia de disolventes orgánicos. La ausencia de disolventes orgánicos la convierte en una técnica más ecológica y la elución a temperaturas elevadas mejora la selectividad y la eficiencia siendo mucho más rápida, aunque puede presentar el inconveniente de la degradación de los analitos a temperaturas elevadas.

La cromatografía de gases y de líquidos son las técnicas principalmente empleadas en la determinación de residuos de pesticidas. Sin embargo, otras técnicas como la cromatografía en capa fina, la electroforesis capilar y las técnicas de inmunoensayo se utilizan también en la determinación de pesticidas, aunque en menor proporción.

La electroforesis capilar (CE) al igual que HPLC son técnicas adecuadas para pesticidas que se descomponen a altas temperaturas o que presentan volatilidades tan bajas que necesitan una etapa previa de derivatización de los mismos. La electroforesis capilar es una técnica importante debido a los bajos requerimientos de muestra y de disolventes orgánicos [46]. Los sistemas de detección empleados en electroforesis capilar son:

- *Detección ultravioleta-visible.* Dado que la mayoría de los instrumentos comerciales de electroforesis poseen un detector UV o de diodos en línea, éste sistema de detección ha sido el más utilizado hasta el momento en electroforesis capilar, incluido el análisis de un gran número de familias de pesticidas, sobre todo triazinas, fenoxiácidos y sales de amonio cuaternario [46]. Generalmente, la detección de estos compuestos se ha llevado a cabo a bajas longitudes de onda, entre 200 y 254 nm, ya que casi todos los pesticidas presentan un máximo de absorción en esta gama de longitudes de onda a las que también pueden absorber multitud de compuestos presentes en matrices reales. Es por ello que este tipo de detección debe utilizarse sólo cuando la muestra es muy limpia, como el caso de aguas, o bien cuando la muestra se ha sometido a un adecuado pretratamiento que incluye diversas etapas de limpieza, para así asegurar la correcta identificación y cuantificación de los analitos.
- *Detección por fluorescencia inducida por láser (LIF).* La primera aplicación de este sistema al análisis de pesticidas, fue realizada en 1995 por Jung y Bumley

para el análisis de pesticidas fenoxiácidos. Desde entonces, han ido surgiendo diferentes métodos de análisis de pesticidas y de algunos de sus metabolitos. A pesar de que la detección por LIF posee una sensibilidad bastante alta, desafortunadamente, los pesticidas no suelen presentar fluorescencia nativa y, por lo tanto, para su determinación por esta vía, es necesario desarrollar un método de derivatización de los mismos, previo a su inyección en electroforesis capilar o bien en el mismo capilar, siempre y cuando éstos presenten grupos funcionales susceptibles de derivatización con un agente apropiado. Además, el producto de la derivatización debe presentar fluorescencia a la longitud de onda de excitación del láser del detector.

- *Detección por espectrometría de masas (MS)*. Este acoplamiento mejora la sensibilidad e información estructural del pesticida, aunque es necesario, técnicas de preconcentración durante la purificación o separación de las muestras debido principalmente, a los pequeños volúmenes de muestra que normalmente se inyectan (1-10 nl) [47].
- *Detección electroquímica*. La detección electroquímica, basada en medidas conductimétricas, amperométricas y potenciométricas, no ha sido tan ampliamente utilizada en electroforesis capilar como las anteriores. A pesar de que este tipo de detección puede proporcionar límites de detección uno o dos órdenes de magnitud mejores que los obtenidos con detección UV (en algunos casos incluso más, dependiendo de las propiedades redox del analito), ha sido utilizada en pocas ocasiones dado que no se trata de un detector universal. Por

ejemplo, la detección amperométrica es compleja al requerir el desarrollo de sistemas de desacoplamiento del instrumento de electroforesis capilar al electrodo de medida. También se hace necesario que el electrodo esté perfectamente alineado con el capilar para asegurar que las medidas sean fiables y reproducibles. A pesar de estas desventajas, el hecho de que proporciona límites de detección bajos y de que se trate de un detector alternativo, ha hecho que se haya utilizado en algunas ocasiones en la determinación de pesticidas como el asulam [48] o de metabolitos de pesticidas, como es el caso de ciertos compuestos aminobencénicos o de algunos clorofenoles [49].

Una alternativa a los métodos de separación son los inmunoensayos [50-53]. Un inmunoensayo es un test bioquímico en el que se mide la concentración de una sustancia en un medio biológico basándose en la reacción de un anticuerpo a un antígeno. La ventaja de los anticuerpos es su elevada afinidad al antígeno en cuestión. Los ensayos ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) son un tipo de inmunoensayo en el que se realizan simultáneamente numerosas determinaciones en una placa de 96 celdas o pocillos. Existen numerosos kits ELISA para detectar la presencia de plaguicidas (tabla 4), y se trata de un procedimiento muy adecuado para controlar la presencia de un residuo en muchas muestras. Sin embargo, requiere de personal altamente cualificado y de un laboratorio bien acondicionado para obtener una buena reproducibilidad.

COMPUESTO DETECTADO	FABRICANTE	COMPUESTO DETECTADO	FABRICANTE
Acetanilidas	EnviroLogix (P)	Fluometuron	Millipore (P,T)
Acetoclor	Millipore (P)	Glifosato	EnviroLogix (P)
Triazinas	Baker (T)	Paraquat	EnviroLogix (P)
Carbaril	Millipore (P)	Paration	Millipore (P) Baker (T)
Ciclodienos	Baker (T)	Paration metílico	EnviroLogix (P)
Clordano	EnviroLogix (P)	Piretroides sintéticos	Millipore (P)
2,4-D	Baker (T) EnviroLogix (P)	Screening para pesticidas	EnviroLogix (P)
DDT	Millipore (P,T)	Insecticidas piretroides	EnviroLogix (P)

P: Kit en placa, T: Kit en tubo

Tabla 4. . Algunos Kits de inmunoensayos para el análisis de pesticidas [54].

Otro sistema rápido disponible en la actualidad son los biosensores. Se trata de un instrumento de medida, basado en un elemento biológico capaz de interactuar con el analito problema, generando una señal analítica proporcional a la concentración de la sustancia problema. En la actualidad existen numerosos grupos de investigación y empresas de biotecnología desarrollando biosensores rápidos y sencillos capaces de detectar la presencia de varios plaguicidas simultáneamente como EnviroLogix, Millipore, etc..

1.2. Metodologías en flujo continuo: F.I.A., multiconmutación, multibombeo

1.2.1. Principios del Análisis por Inyección de Flujo

De entre todas las metodologías existentes para la automatización, el Análisis por Inyección de Flujo (Flow Injection Análisis, FIA), ha experimentado un rápido desarrollo desde la introducción del concepto original por Růžička y Hansen [55] (1975) (Dinamarca) y Stewart y Beecher [56] (1976) (E.E.U.U), abarcando en la actualidad casi todos los campos analíticos. Aunque resulta difícil formular una definición de FIA que englobe a las diferentes modalidades que del mismo han ido surgiendo desde sus comienzos, se podría decir que se trata de un tipo de análisis automatizado en flujo continuo, que se basa en la inserción y dispersión controlada de un volumen de disolución en una corriente continua de un portador, que lo transporta hasta el detector donde se genera una señal transitoria en forma de pico (figura 17), denominada fiagrama.

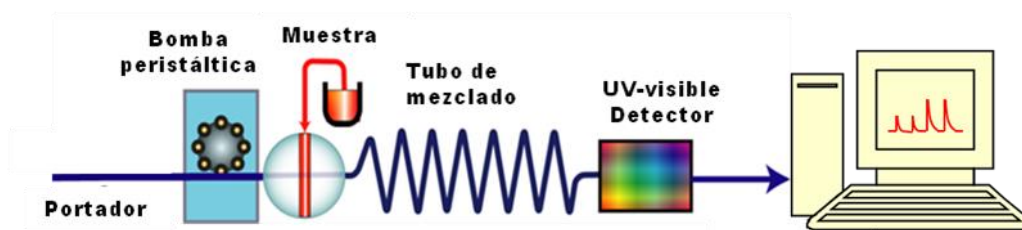


Figura 17. Esquema de un montaje monocanal FIA.
FIALab. Instruments (<http://www.flowinjection.com>)

En palabras de Růžička y Hansen:

“Flow Injection Analysis (FIA) is an automated, continuous flow approach to perform chemical analysis. In contrast to conventional continuous flow procedures, FIA is based on measuring transient signal readouts, which opens new and novel avenues to perform an array of chemical analytical assays, many of which are not possible to implement by any other way”.[55]

Las condiciones de trabajo habituales en FIA ocasionan que el bolo de muestra inyectado no alcance el equilibrio químico ni físico, y que además éste se diluya (disperse) en la disolución portadora o en el reactivo. El régimen laminar produce una zona bien definida de bolo de muestra inyectado produciéndose un gradiente de concentración a lo largo de todo el bolo. En la figura 18, se muestra la dispersión que sufre la muestra a lo largo de una configuración FIA.

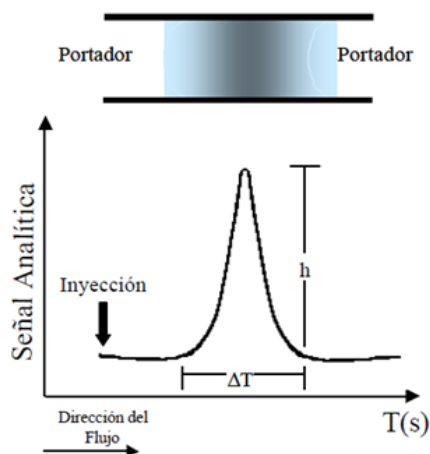


Figura 18. Señal analítica obtenida en FIA.

Las ventajas inmediatas del trabajo en flujo frente a los procedimientos analíticos son una mayor reproducibilidad en las determinaciones, una mayor velocidad en el

muestreo y una reducción en el consumo de reactivos y muestra, con la consiguiente reducción del coste del análisis y la disminución de desechos (*Green Chemistry*).

El FIA pertenece a los métodos cinéticos de análisis de medidas en tiempo fijo, ya que normalmente no se requiere que la muestra insertada alcance el equilibrio químico antes de ser detectada. Este hecho facilita la medida de intermedios de reacción, frente a técnicas convencionales en estático, mostrándose muy eficaz también para automatizar métodos catalíticos consiguiendo una gran reproducibilidad en las señales analíticas. La versatilidad de la metodología FIA permite llevar a cabo la mayoría de las operaciones asociados al análisis químico: filtración y redisolución de precipitados, extracción líquido-líquido, reacciones de formación y recogida de gases, utilización de reactivos sólidos o inmovilizados.

Un sistema moderno de análisis por inyección en flujo (figura 19) consiste, por lo general, en una bomba peristáltica con un cabezal multicanal, una válvula rotatoria de inyección, un reactor en espiral, y un detector provisto de una celda de flujo. Los componentes adicionales pueden incluir un calefactor para incrementar la velocidad de las reacciones químicas, reactores en fase sólida para el tratamiento de las muestra (reducción, oxidación, preconcentración, eliminar interferentes), desburbujadores, filtros para la eliminación de partículas, etc.

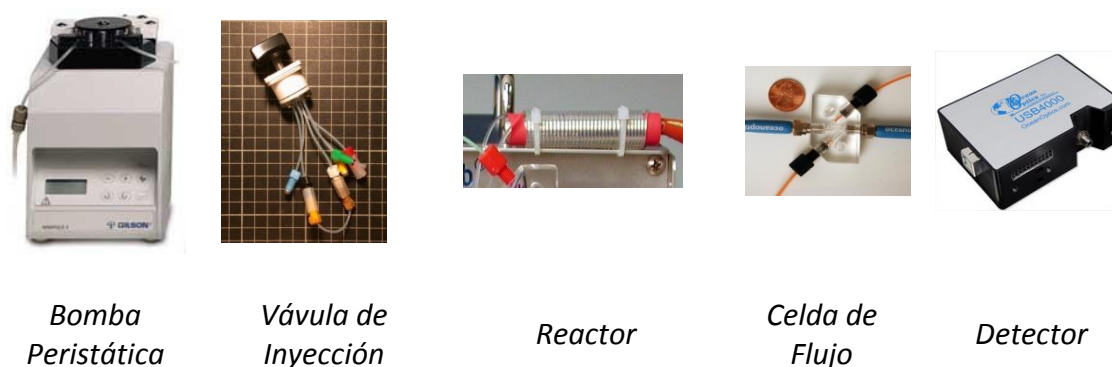


Figura 19. Diseño modular de un sistema FIA actual.

La modalidad **FIA Lab-On-Valve (LOV)** (figura 20) integra todas las conexiones, el bucle de la muestra, y la celda de flujo en un montaje más simple y compacto.

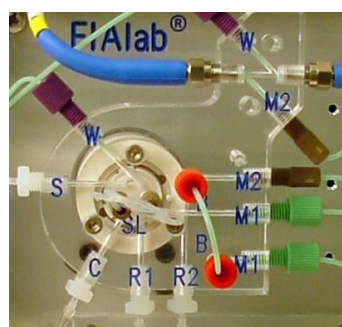


Figura 20. FIA Lab-On-Valve (LOV).
(FIAlab Instruments <http://www.flowinjection.com>)

Una evidencia de la versatilidad del FIA se ilustra en las figuras 21 y 22, donde se muestra el porcentaje de artículos publicados sobre FIA, desde el año 1980 hasta la actualidad, en función del tipo de muestra analizada (figura 21), y del tipo de detección empleado (figura 22).

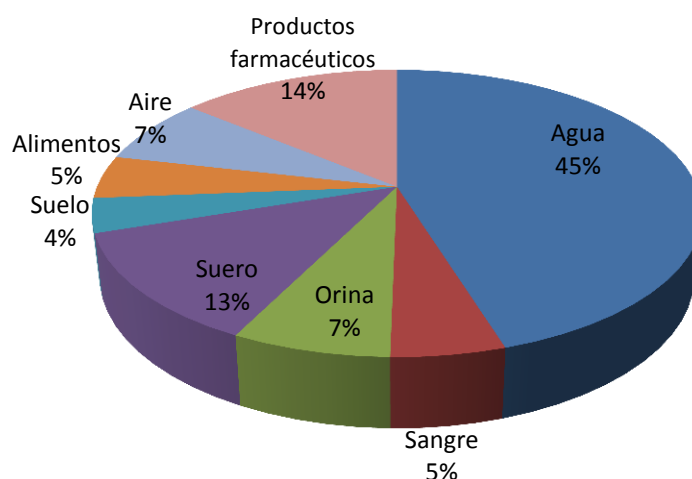


Figura 21. Proporción entre los tipos de muestras detectadas en FIA.
(Fuente: base de datos Chemical Abstract 1980-2014).

En relación con las áreas de aplicación de la metodología FIA, el análisis medioambiental ha recibido mayor atención, especialmente los métodos FIA para el análisis de agua (45%), siendo también importante el análisis de los productos farmacéuticos (14%) y los análisis de muestras clínicas: sangre (5%), suero (13%) y orina (7%).

Las técnicas instrumentales más utilizadas en FIA son la espectrofotometría UV-vis y las técnicas luminiscentes, especialmente la quimioluminiscencia (26%). Entre ambas comprenden casi un 50% de los trabajos publicados, muy por encima de las técnicas electroanalíticas, entre las cuales destacan la potenciometría (4%) y la amperometría (8%).

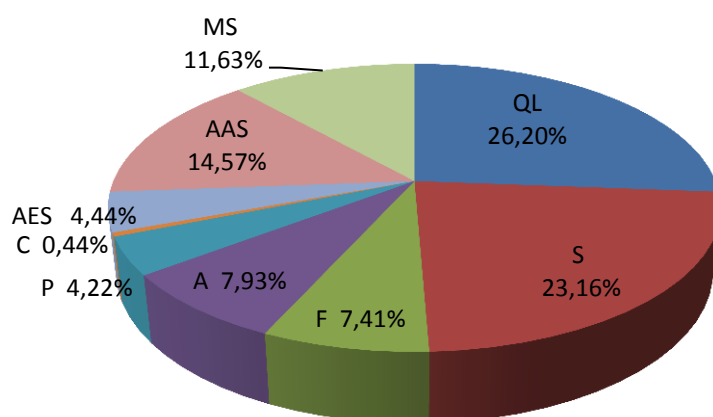


Figura 22. Proporción entre los tipos de detección empleados en FIA.
(Fuente: base de datos Chemical Abstract 1980-2014)

Sin embargo, pese a la elevada productividad científica de los distintos grupos de investigación distribuidos por todo el mundo, que han dado lugar a un gran número de publicaciones sobre FIA (21189 referencias bibliográficas recogidas en la base de datos del Profesor Hansen-FIALab desde su introducción por Růžička y Hansen en 1975 hasta la actualidad, noviembre de 2014), contrasta la escasa difusión comercial que ha tenido el FIA, pese a haberse demostrado las grandes posibilidades que ofrece como herramienta en análisis de rutina. Posiblemente, está desproporción entre el interés científico y la implantación real en laboratorios de control analítico de aguas, alimentos, medicamentos, análisis clínico y medioambiental, etc, se deba a que, aunque los métodos FIA se ha clasificado dentro del grupo de métodos automáticos de análisis, dichos métodos, en sentido estricto, son métodos “semiautomatizados”, que en la mayoría de los casos siguen requiriendo un alto grado de control y supervisión por parte del operador, el cual debe conocer con cierta profundidad los fundamentos de la metodología, así como los detalles operativos del sistema FIA, para obtener unos

resultados analíticos fiables y de calidad. La versatilidad, característica también resaltada de forma reiterada para los sistemas FIA, ya que la configuración del montaje propiamente dicho puede adaptarse a prácticamente cualquier requerimiento y/o operación analítica (valoraciones on-line, precipitación, filtración, destilación, extracción líquido-líquido, sólido-líquido, etc), debe entenderse también en términos relativos, puesto que la reconfiguración del sistema para adaptarlo a una nueva determinación analítica exige, en la mayoría de los casos, una modificación de la arquitectura del montaje. También, debido a que el fundamento del FIA recae en la dispersión controlada de muestra y reactivos en el seno del sistema de flujo, la determinación secuencial multiparamétrica en un solo montaje conlleva incrementar el grado de complejidad del mismo, aumentando el número de líneas y la longitud de serpentines y reactores, con la finalidad de que se produzca una separación espacio-temporal de los diferentes bolos de muestra-reactivo al alcanzar el detector.

La válvula rotatoria y la bomba peristáltica son, con mucho, los medios más comunes de introducir e impulsar las líneas de flujo de muestra y reactivos a través del sistema de flujo. Son robustos y fiables, pero presentan algunas deficiencias funcionales; por ejemplo, las válvulas rotatorias trabajan con bucles de volumen fijo, y una variación continua en tamaño de la muestra requiere una reconfiguración física del montaje de flujo. El volumen de la muestra se define por la longitud del bucle de muestra y el volumen interno de la válvula rotatoria; los volúmenes más pequeños insertables corresponden al volumen interno de la válvula y por lo general son de decenas de microlitros; y grandes volúmenes no permiten una mezcla eficiente de la zona central del bolo de la muestra con el portador a menos que se aumenten los

tiempos de residencia por medio del uso de reactores de gran longitud. Además, después de cada inyección, el bucle de muestra debe ser lavado con un volumen adicional de la muestra para limpiar las paredes internas del mismo que se han bañado con la disolución portadora. Por otro lado, las bombas peristálticas son relativamente caras, grandes, requieren un consumo de energía no despreciable, la sustitución periódica de los tubos del cabezal y producen un flujo pulsante, debido al mecanismo de propulsión. El resultado es que los sistemas FIA presentan una versatilidad limitada y que muestran características más próximas a una pseudo-automatización real.

Estas consideraciones ponen de manifiesto que la evolución del análisis en flujo viene determinado considerablemente por las unidades de propulsión e inyección del sistema de flujo.

1.2.2. Multiconmutación en flujo

Las metodologías de flujo conocidas como multi-conmutación [57] y *multi-pumping* (de ahora en adelante multi-bombeo), especialmente cuando se combinan en un mismo montaje, presentan una atractiva alternativa a los métodos FIA, ya que a diferencia de estos, posibilitan una de las vías más sencillas para conseguir métodos analíticos cada vez más cerca de la plena y verdadera automatización; una versatilidad real, dado que es posible una reconfiguración lógica del sistema *via* software, sin modificar la estructura física del sistema de flujo; y, finalmente, una miniaturización factible, debido al reducido peso y dimensiones de los elementos de multi-conmutación que les son característicos, como son las válvulas y bombas solenoides.

La válvula solenoide (figura 23 y 24) consta de tres puertos y tiene dos estados: ON y OFF. Dos de los tres puertos de la válvula permanecen conectados permanentemente. Cuando la válvula está en OFF, la disolución portadora fluye hacia el detector; cuando está en ON, un pulso eléctrico de duración programable permite la inserción de la muestra en el portador. Cuando el impulso eléctrico llega a la válvula, la armadura es atraída hacia el cuerpo de la válvula y el muelle experimenta una compresión. Estos cambios resultan en la obturación de la entrada de portador y una apertura de la entrada de muestra que es expulsada a continuación fuera de la válvula en dirección al detector.



Figura 23. Aspecto de una válvula solenoide.
(NRResearch Inc. <http://www.nresearch.com>).

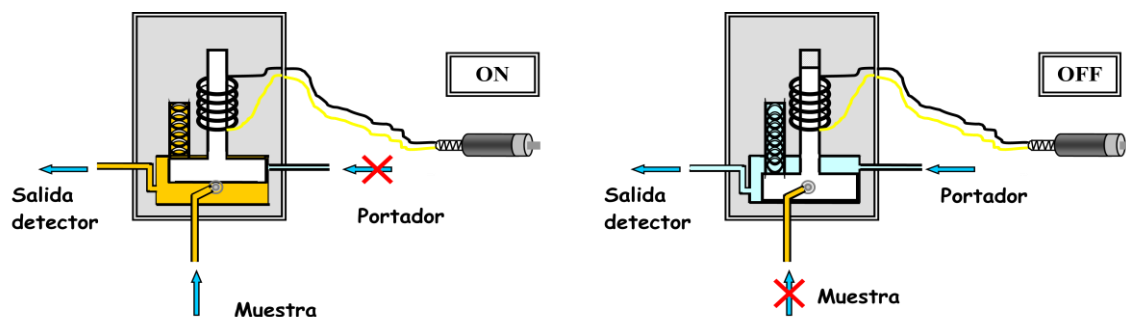


Figura 24. Configuración ON/OFF de una válvula solenoide.

El volumen de muestra insertado es proporcional a la duración del pulso y puede modificarse alterando el perfil de la secuencia de inserción: es posible la inserción de un solo segmento de muestra o de varios segmentos idénticos o de distintos volúmenes alternados con disolución portadora (figura 25). El resultado es un sistema versátil que permite la inserción de volúmenes variables de muestra vía software. Además, el control electrónico de la duración de los pulsos garantiza la inserción reproducible de volúmenes muestra de unos pocos microlitros.

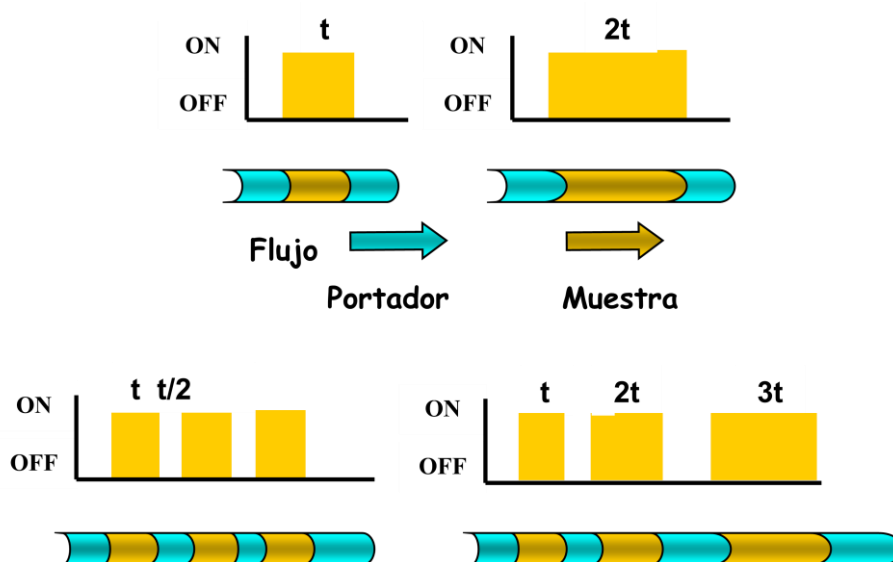


Figura 25. Secuencias de inserción y perfiles de inserción obtenidos con una válvula solenoide.

Desde un punto de vista conceptual, las principales aportaciones de la multiconmutación (“flow-networks” de válvulas solenoides) al análisis en flujo consisten en la sustitución de los “volúmenes” de inserción por “tiempos” de inserción, lo cual permite desarrollar métodos de muestreo basados en el tiempo; y, la noción del montaje de flujo como un sistema activo, versátil y fácil de reconfigurar: la implementación de válvula solenoide de tres puertos en un sistema de flujo presenta

una estructura funcional controlada por un ordenador. El resultado es un flujo en red, el cual se podría asimilar a un circuito electrónico que presentase un número variable de nodos activos que podrían adoptar de forma independiente en el tiempo dos estados posibles: ON y OFF. De este modo, el control de la dispersión de muestra y reactivos se puede realizar de forma eficaz abriendo nuevas posibilidades en el análisis en flujo.

La multiconmutación no debe entenderse como una simple alternativa más cómoda y eficaz a los métodos FIA-clásicos en la inserción de disoluciones de muestra y reactivos en una corriente de portador. El empleo de pequeñas redes con nodos en forma de válvulas solenoides actuando como conmutadores y controladas por un ordenador a través de un software sencillo, que permite modificar la configuración del montaje (ciclos de apertura y cierre), sin necesidad de alterarlo físicamente y manipularlo, amplía enormemente las posibilidades analíticas del análisis en flujo continuo. Las principales ventajas derivadas de ello son:

- a) *Minituarización de los montajes en flujo.*- El reducido tamaño de las válvulas solenoide y de las interfases electrónicas permite el desarrollo de equipos integrados de reducido tamaño y de instrumentación portátil para efectuar análisis *"in situ"*.
- b) *Disminución del consumo de muestra y reactivos.*- Configuraciones básicas en multiconmutación permiten que muestra y reactivos sean microdispensados de forma muy precisa; volúmenes de unos pocos μL , correspondientes a

- fracciones de segundo de tiempos de inserción, pueden obtenerse de forma muy reproducible.
- c) *Aumento de la reproducibilidad.* La intervención del operador es mínima. El proceso de inserción (secuencia de los ciclos de apertura y cierre de cada una de las válvulas del montaje en flujo) es controlado por un ordenador *vía* software. La multiconmutación favorece el diseño de métodos de análisis completamente automatizados.
- d) *Economía y sencillez.*- El precio de una válvula solenoide de tres puertos es sensiblemente inferior al de una válvula rotatoria convencional de las empleadas en FIA. Además, la sencillez y tamaño del dispositivo requiere poco consumo de energía, por lo que no es necesario una fuente de alimentación suplementaria (una tarjeta conectada directamente al ordenador controla todo el sistema).
- e) *Versatilidad.*- A diferencia de la metodología FIA, la multiconmutación permite alterar la longitud de reactores, volúmenes de muestra insertados, en definitiva, todas aquellas variables que inciden directamente en los perfiles de dispersión, sin necesidad de modificar físicamente el montaje. La reconfiguración del mismo se puede llevar a cabo mucho más fácilmente reprogramando la duración de los impulsos eléctricos que controlan la apertura y cierre de las válvulas, o bien, la secuencia de conmutación de las mismas.
- f) *Ampliación de las modalidades de análisis en flujo.*- El “control electrónico” de la dispersión (mejor control espacio-temporal de la dispersión frente al FIA) y la mayor versatilidad asociada a la multiconmutación permiten la

implementación segura de modalidades de gradiente (stopped-flow, confluencia de zonas, penetración de zonas, muestreo de zonas), de procedimientos automatizados para determinaciones multiparamétricas y de montajes multicanales complejos que pueden ser manipulados de forma simple y eficaz.

Sin embargo, frente a estas importantes ventajas, hay que mencionar algunas limitaciones:

- a) *Limitaciones en los volúmenes de inserción.*- Cuando los segmentos de muestra y reactivos introducidos son muy pequeños se hace necesario sincronizar la unidad de bombeo y las microinserciones, en caso contrario, los pulsos de la bomba distorsionarían de forma irreproducible los perfiles de dispersión.
- b) *Comercialización de equipos.*- La no disponibilidad comercial de los equipos (interfaces electrónicas y software para el control de las válvulas solenoides) se pone de manifiesto en el hecho de que prácticamente la totalidad de los trabajos publicados relacionados con multiconmutación hacen uso de hardware and software home-made. Recientemente, Biochem-Fluidics (<http://www.biochemfluidics.com/>) ha comercializado su propio controlador (Flow Test Controler) para microdispositivos solenoides (válvulas y bombas).

1.2.2.1. Aplicaciones del análisis por multiconmutación

La multiconmutación ha sido utilizada en numerosas aplicaciones analíticas que son recogidas en la tabla 5. En ellas se detallan el analito, el detector utilizado, el límite

de detección, la desviación estándar relativa, la velocidad de muestreo y el número de válvulas solenoides empleadas en el montaje de flujo.

Finalmente, en la tabla 6, se recogen los trabajos publicados hasta la fecha que hacen uso de la multiconmutación aplicada a la detección de pesticidas.

Tabla 5. Aplicaciones analíticas de la multiconmutación.

Analito (matriz)	Detector	Límite de detección (Intervalo de linealidad)	dsr (%) (n) (concentración)	Velocidad de muestreo (h ⁻¹)	Número de válvulas solenoides	Año	[Ref.]
Nitrito	S (545 nm)	4 µg L ⁻¹ (0-100)	-	-	15	1988	[58]
Nitrato		30 (0-50)					
Amonio (agua)		5 (0-120)					
Cloruro (agua, refrescos)	ISE	(10 ⁻² – 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹)	2 (n=10)	48	2	1993	[59]
I ₂ (agua, orina)	S (464 nm)	0-10 mg L ⁻¹	-	-	3	1994	[60]
Hierro (plantas)	S (480 nm)	(0-10 mg L ⁻¹)	<3	220	4	1994	[61]
Niquel Hierro Cromo (aleaciones de acero)	S	(5-50 mg L ⁻¹) (25-200) (20-60)	1	60 130 130	4 5 5	1995	[62]
Arsénico (cerveza, tomate, mejillón, hígado)	ICP AES	0,5 ng g ⁻¹ 2 50 5	8 11 9 4	-	-	1995	[63]

Tabla 5: Aplicaciones analíticas de la multiconmutación (continuación).

Analito (matriz)	Detector	Límite de detección (Intervalo de linealidad)	dsr (%) (n) (concentración)	Velocidad de muestreo (h ⁻¹)	Número de válvulas solenoides	Año	[Ref.]
Creatinina (orina)	S (520 nm)	-	2,9 (n=10) (1,26 g L ⁻¹)	24	3	1995	[64]
Amonio Metilaminas (agua, aire)	C	0-1000·10 ⁻⁹ mol L ⁻¹ 0-100·10 ⁻⁹ mol L ⁻¹	< 8	Agua (t.difusión) 20-60 mín. Aire (t.difusión) 20 mín.	4	1995	[65]
Cobalto (sangre)	ET AAS	0,3 µg L ⁻¹ (0-50)	(2,6) (n=10) (5 mg L ⁻¹)	-	-	1995	[66]
Cobre (agua)	AAS	1,5 µg L ⁻¹ (2-65)	2,5 4,2	80	5	1995	[67]
Hipoxantina (carne de pescado)	QL	(1 µM-3 mM)	-	-	3	1996	[68]
Calcio Potasio (materiales de plantas)	AAS/AES	(0-100 mg L ⁻¹) (0-10)	1 (n=10) (100 mg L ⁻¹)	50 70	5 4	1996	[69]
Cobre Cinc (plantas)	S (620 nm)	0,05 mg L ⁻¹ (0-1) 0,04 (0-2)	0,7 (1 mg L ⁻¹) 1,7 (2 mg L ⁻¹)	45	5	1996	[70]
Fosforo (aguas residuales)	S (635 nm)	Hasta 2 mg L ⁻¹ (0,05 mg L ⁻¹)	-	-	2	1996	[71]
Amonio Fosfato (plantas)	S (660 nm)	(25-125 mg L ⁻¹) (2,5-12,5)	2 (n=8) (73,1 mg L ⁻¹) 1,5 (n=8) (8,3 mg L ⁻¹)	80	6	1996	[72]

Tabla 5: Aplicaciones analíticas de la multiconmutación (continuación).

Analito (matriz)	Detector	Límite de detección (Intervalo de linealidad)	dsr (%) (n) (concentración)	Velocidad de muestreo (h ⁻¹)	Número de válvulas solenoides	Año	[Ref.]
Sulfato (plantas)	T (410 nm)	(0-500 mg L ⁻¹)	2 (n=11)	100	5	1998	[73]
Calcio (leche, plantas)	S (575 nm)	7 µg L ⁻¹ (0,25-1000 mg L ⁻¹)	0,83 (n=10)	60	5	1998	[74]
Pindolol (productos farmacéuticos)	S (635 nm)	(5-120 µg L ⁻¹)	1,1 (n=10)	-	5	1998	[75]
Cefalexina (productos farmacéuticos)	S (262 nm)	1,57 mg L ⁻¹ (0- 1250)	0,66	180	2	1998	[76]
Nitrito	S (328 nm)	3,3·10 ⁻⁷ mol L ⁻¹ (0-1,45·10 ⁻⁴ mol L ⁻¹)	0,4 (n=15) (6,4·10 ⁻⁵ mol L ⁻¹)	15	1	1998	[77]
Nitrato (diferentes matrices)		1,9 ·10 ⁻⁷ mol L ⁻¹ (0-0,85·10 ⁻⁴ mol L ⁻¹) 3,3·10 ⁻⁷ mol L ⁻¹ (0-1,45 ·10 ⁻⁴ mol L ⁻¹)					
Cadmio Plomo Niquel (aguas naturales)	ET-AAS (231,2 nm) (217 nm) (232 nm)	2,2 ng L ⁻¹ 23 75	<5 <4 <6	30	4	1998	[78]
Boro (plantas)	S (420 nm)	0,47 mg L ⁻¹ (0,25-6)	2,5 (n=9) (5,4 µg L ⁻¹)	36	5	1998	[79]
Manganeso (brotes soja)	S (548 nm)	1,2 mg L ⁻¹ (2,5-40)	0,27 (n=9) (17,1 mg L ⁻¹)	50	4	1999	[80]

Tabla 5: Aplicaciones analíticas de la multiconmutación (continuación).

Analito (matriz)	Detector	Límite de detección (Intervalo de linealidad)	dsr (%) (n) (concentración)	Velocidad de muestreo (h ⁻¹)	Número de válvulas solenoides	Año	[Ref.]
Glucosa (zumos con azúcar de caña, refrescos)	S (510 nm)	(0,05-0,2% (w/v))	0,3 (n=6) (0,1%(w/v))	30	4	1999	[81]
Arsénico (III) Arsénico (V) (agua potable)	PSVI	(0-60 µg L ⁻¹) (0-350)	2,2 (n=8)	-	4	1999	[82]
Bismuto (III) Plomo (II) (acero, papel aluminio)	ET AAS	0,2 µg L ⁻¹ 0,21 (1-5)	4 1,9	-	7	2000	[83]
Plata Cadmio Mercurio Plomo Talio (alimentos)	ET ICP MS	(0,15-41 ng g ⁻¹)	-	-	5	2000	[84]
Amilorida clorhidrato (productos farmacéuticos)	S (545 nm)	1 mg L ⁻¹ (0-120)	< 2,2 (n=10)	30	5	2000	[85]
Etanol (bebidas alcohólicas)	S (600 nm)	(10-50)	1,6 (n=11)	40	4	2000	[86]
Fenol (aguas naturales)	QL	(5 µg L ⁻¹)	1,1	12-60	1	2000	[87]

Tabla 5: Aplicaciones analíticas de la multiconmutación (continuación).

Analito (matriz)	Detector	Límite de detección (Intervalo de linealidad)	dsr (%) (n) (concentración)	Velocidad de muestreo (h ⁻¹)	Número de válvulas solenoides	Año	[Ref.]
Nitrito	S (LED rojo/verde)	5 µg L ⁻¹ (0,025-1,0)	0,32	60	8	2000	[88]
Nitrato		15 (0,10-5,0)	0,42	30			
Amonio (agua de río)		25 (0,1-2,0)	0,72	60			
Cloro (pastillas, agua)	S (445 nm)	0,05 mg L ⁻¹ (0,5-1,30)	1,5 (0,72 mg L ⁻¹)	38	3	2001	[89]
Sulfato (plantas, hígado bovino, sangre)	S (410 nm)	30 mg L ⁻¹ (40-200)	2 (n=6) (120 mg L ⁻¹)	40	2	2001	[90]
Nitrito	S(CCD-array) (280-840 nm)	6 µg L ⁻¹ (30-300mg L ⁻¹)	1,6	50	5	2001	[91]
Nitrato		40 µg L ⁻¹ (0,1-1,0 mg L ⁻¹)	2,2				
Cloruro		400 µg L ⁻¹ (1,0-10 mg L ⁻¹)	2,3				
Fosfato (agua)	(455, 800 nm) (716, 450 nm)	30 µg L ⁻¹ (0,05-2,5 mg L ⁻¹)	1,5 (n=20)				
Hierro	S (508 nm) (625 nm) (535 nm) (570 nm) (570 nm)	0,2 mg L ⁻¹ 0,2 0,05 10 10	1	60	8	2001	[92]
Cinc			1,5				
Cobre			1,4				
Calcio			2,5				
Magnesio (productos farmacéuticos)			2 (n=20)				

Tabla 5: Aplicaciones analíticas de la multiconmutación (continuación).

Analito (matriz)	Detector	Límite de detección (Intervalo de linealidad)	dsr (%) (n) (concentración)	Velocidad de muestreo (h ⁻¹)	Número de válvulas solenoides	Año	[Ref.]
Lactato (materiales de ensilaje)	S (510 nm)	2 mg L ⁻¹ (10,0–100,0)	2 (n=15) (75 mg L ⁻¹)	16	6	2001	[93]
Acido láctico (yogurt)	QL	1,6 mg L ⁻¹ (10–125)	1,9 (n=10) (25 mg L ⁻¹)	55	6	2001	[94]
Cobalto (vitamina B12)	QL	15 ng L ⁻¹ (15 ng L ⁻¹ – 5 µg L ⁻¹)	1 (n=8) (1 ng mL ⁻¹)	180	1	2002	[95]
Cadmio Niquel Plomo (alimentos, plantas)	ICP-AES	1 mg L ⁻¹ 4 2	2,5 2,6 4,0	90	3	2002	[96]
Acidez total (extractos de ensilaje)	S	(10 ⁻³ -10 ⁻¹ mol L ⁻¹)	<1 (26 mmol L ⁻¹)	16	1	2002	[97]
Amonio Fosfato (agua de rio)	S (LEDs) (660 nm)	7,0 µg L ⁻¹ 17,0	1,1 0,7 (n=6)	112	6	2002	[98]
Ácido ascórbico (productos farmacéuticos)	ISE	(7,5-15 mmol L ⁻¹)	1 (n=6) (12,3 µmol L ⁻¹)	15	1	2002	[99]
Aluminio (agua comercial)	F (380/490 (λex/λem))	0,5 µg L ⁻¹ (10-500)	0,6 (n=9) (30 µg L ⁻¹)	154	1	2002	[100]
Colesterol (suero animal)	QL	3,7 mg L ⁻¹ (25 – 125)	2,3	40	3	2003	[101]

Tabla 5: Aplicaciones analíticas de la multiconmutación (continuación).

Analito (matriz)	Detector	Límite de detección (Intervalo de linealidad)	dsr (%) (n) (concentración)	Velocidad de muestreo (h ⁻¹)	Número de válvulas solenoides	Año	[Ref.]
Vitaminas solubles	S						
Àc.ascórbico	700nm	0,08 mg L ⁻¹ (0,5-10,0)	1,2				
Tiamina	367nm	0,8 (2,0-50,0)	0,9	60	8	2003	[102]
Riboflavina	510nm	0,2 (5,0-50,0)	1,8				
Piridoxina (productos farmacéuticos)	684nm	0,1 (0,5-8,0)	0,9 (n=20)				
Acido 3-hidroxi-butírico (suero, plasma animal)	S (340nm)	2 mg L ⁻¹ (10-150)	1,2 (n=17)	60	3	2003	[103]
Cromo Cobalto (agua de río, de la costa, del puerto, residual de industria metalúrgica)	QL	0,2 µg L ⁻¹	5,5 5,3 (n=5) (1 µg L ⁻¹)	40	2	2003	[104]
Hidratos de carbono (piensos)	S (460 nm)	0,12% (w/v) (0,2-0,8)	2 (n=10)	32	5	2003	[105]
Mercurio (agua)	AFS (354,7 nm)	1,3 ng L ⁻¹ (0-1,5)	0,09 (n=10) (0,6 ng L ⁻¹)	40	3	2003	[106]
Molibdeno (plantas)	S (475nm)	4,6 µg L ⁻¹ (25-150)	2,5 (n=10)	25	6	2003	[107]

Tabla 5: Aplicaciones analíticas de la multiconmutación (continuación).

Analito (matriz)	Detector	Límite de detección (Intervalo de linealidad)	dsr (%) (n) (concentración)	Velocidad de muestreo (h ⁻¹)	Número de válvulas solenoides	Año	[Ref.]
Fenoles (aguas)	S (500nm)	1 µg L ⁻¹ (10-100)	0,6 (n=10)	90	5	2004	[108]
Hidroquinona (medicamentos, aguas superficiales, soluciones fotográficas)	QL	30 µg L ⁻¹ (0,1-15,0)	4,2-2,7 (n=15) (5-50 mg L ⁻¹)	103	3	2004	[109]
Albúmina Proteína total (plasma sanguíneo)	S (LEDs) 554nm 645nm	0-15 g L ⁻¹ (0-15)	1,5 0,8 (n=10)	45 140	5	2004	[110]
Aluminio (plantas, agua)	F (420/510 (λex/λem))	0,04 mg L ⁻¹ (0,1 - 1,0)	1,7 (n=7) (0.5 mg L ⁻¹)	60	5	2004	[111]
Alfa-olein sulfonato de sodio (detergentes)	ATR-FTIR	1,2% (w/w)	0,3 (n=4) (7,48% (w/w))	23	4	2004	[112]
Cromo Cobre Hierro Plomo (aceites lubricantes)	FAAS (357,9 nm) (324,7 nm) (248,8 nm) (283,3 nm)	(0-15 mg L ⁻¹) (0-40) (0-40) (0-15)	2 8 8 8 (n=5)	50	3	2004	[113]
Teluro (leche)	HG-AFS	0,20 ng L ⁻¹ (0-0,5)	2,1 (n=3)	20	3	2004	[114]
Glicerol (vino)	S (340 nm)	0,006 g L ⁻¹ (2-10)	1,8 (n=14)	33	4	2004	[115]
Benceno (gasolina)	FTIR	0,004% (v/v) (0,02-0,8)	1,2 (n=10) (3% (v/v))	81	3	2004	[116]

Tabla 5: Aplicaciones analíticas de la multiconmutación (continuación).

Analito (matriz)	Detector	Límite de detección (Intervalo de linealidad)	dsr (%) (n) (concentración)	Velocidad de muestreo (h ⁻¹)	Número de válvulas solenoides	Año	[Ref.]
Mercurio (leche)	HG-AFS (354 nm)	0,011 ng g ⁻¹	3,4 (n=5) (0,30 ng g ⁻¹)	70	4	2004	[117]
Captopril Hidroclortiazida Sulfametoxazol Trimetoprim (productos farmacéuticos)	S (254nm)	50 mg L ⁻¹ 40 10 10	1,5 1,6 <10 <10	-	2	2004	[118]
Metronidazol (productos farmacéuticos)	S (623 nm)	-	2,3 (n=6)	60	8	2004	[119]
Clomipramina (productos farmacéuticos)	QL	0,62-0,70 µg mL ⁻¹ (2,5-60)	< 4,6 (n=4)	19-32	2	2004	[120]
Fosfato	QL	4 µg L ⁻¹ (5 – 50)	3	11	6	2005	[121]
Cafeína Salicilamida (medicamentos)	S (272 nm) (300 nm)	0,33 µg mL ⁻¹ (2–30) 0,15 (1–14)	2,06 (n=10) 1,78 (n=10) (8 µg ml ⁻¹)	-	4	2005	[122]
Surfactante aniónico (agua)	S (654 nm)	1,7 ng L ⁻¹	5,9	40	6	2005	[123]

Tabla 5: Aplicaciones analíticas de la multiconmutación (continuación).

Analito (matriz)	Detector	Límite de detección (Intervalo de linealidad)	dsr (%) (n) (concentración)	Velocidad de muestreo (h ⁻¹)	Número de válvulas solenoides	Año	[Ref.]
Furosemida (productos farmacéuticos)	F (272/413 (λex/λem))	15 ng mL ⁻¹ (50-1200)	2,4 (n=10) (600 ng mL ⁻¹)	10	4	2005	[124]
Triamtereno (productos farmacéuticos, orina, suero)	(361/438)	0,1 (0,4-8)	0,82 (5) (n=10)				
Plomo (plantas)	S (520 nm)	12 μg L ⁻¹ (50 – 200)	1,8 (n=12) (163 μg L ⁻¹)	15	5	2005	[125]
Ciclamato (edulcorantes)	S (350nm)	30 μmol L ⁻¹ (100–3000)	1,8 (2 μmol L ⁻¹)	60	4	2005	[126]
Surfactantes aniónicos (agua estanque)	S (225 nm)	10 ng mL ⁻¹ (0,030 - 1 μg mL ⁻¹)	3,7 (n=8) (10 μg)	-	5	2005	[127]
Propranolol (productos farmacéuticos)	QL	(5-120 mg L ⁻¹)	< 1,6 (n=7)	27	2	2005	[128]
Hierro (II)		0,5 μg L ⁻¹ (2–10)	0,2				
Hierro (III)		0,5 (2–10)	0,2				
Nitrato	S (LED) 530 nm	30 (50 – 400)	0,7	40	7	2005	[129]
Nitrito (aguas superficiales)		18 (50 – 400)	0,5				

Tabla 5: Aplicaciones analíticas de la multiconmutación (continuación).

Analito (matriz)	Detector	Límite de detección (Intervalo de linealidad)	dsr (%) (n) (concentración)	Velocidad de muestreo (h ⁻¹)	Número de válvulas solenoides	Año	[Ref.]
Nitrito (aguas residuales)	S (LEDs) (525 nm)	0,17 mg L ⁻¹ (0-250)	2,8 (n=10)	35	3	2006	[130]
Fósforo (plantas)	S (366nm)	24 µg L ⁻¹ (0,5 - 25,0 mg L ⁻¹)	3,5 (n=10)	38	6	2006	[131]
Cobre (suero)	FAAS (357,9 nm)	0,035 mg L ⁻¹ (0- 5)	8,11 (n=10) (25 mg L ⁻¹)	12	6	2006	[132]
(orina)		0,67 µg L ⁻¹ (0-300)	2,54 (n=10) (25 µg L ⁻¹)				
Sodio	S						
Potasio	(598 nm)	(0,5-350 g L ⁻¹)	1	70			
Calcio	(766,5 nm)	(50-150 mg L ⁻¹)	1,6	75	5	2006	[133]
Magnesio	(422 nm)	(30-120 mg L ⁻¹)	13	70			
(soluciones parenterales)	(285 nm)	(20-40 mg L ⁻¹)	0,9 (n=5)	58			
Paracetamol (productos farmacéuticos)	S (640 nm)	0,4 mg L ⁻¹ (5-125)	1,5 (n=11)	60	2	2006	[134]
Acido tartárico (vino)	S (490 nm)	(0.50 and 10.0 g L ⁻¹)	2,1 (n=8)	28	3	2006	[135]
Acidez (vino tinto)	S LED 545 nm	(5,70-8,50 g L ⁻¹)	2 (n=9)	22	5	2006	[136]

Tabla 5: Aplicaciones analíticas de la multiconmutación (continuación).

Analito (matriz)	Detector	Límite de detección (Intervalo de linealidad)	dsr (%) (n) (concentración)	Velocidad de muestreo (h ⁻¹)	Número de válvulas solenoides	Año	[Ref.]
Piroxicam	HPLC	0,27 µg mL ⁻¹ (1-15)	1,19 (n=10) (6 µg mL ⁻¹)	-	4	2006	[137]
Piridoxina		1,2 (5-50)	2,97 (24) (n=10)				
Niquel (aleaciones acero)	S	1 mg L ⁻¹ (MSFA) (Monosegmentes Flow Analysis)	0,7	40	3	2006	[138]
		2,5 (FIA-MBS) (Multicommutation Binary Sampling)‡	1,6				
		2,7 (FIA-SS) (Sandwich Sampling)	1,8				
		3,1 (n=10)	40				
		3,3 (SIA) (Sequential Injection Analysis)	3,1 (40 mg L ⁻¹)				
Amonio	S (410 nm)	1 µg mL ⁻¹ (1-18)	2,1 (n=15) (6 µg L ⁻¹)	86			
Fosfato	(716)	0,5 µg mL ⁻¹ (0,5-10)	5,5 (n=15) (5 µg L ⁻¹)	75	3	2007	[139]
Nitrito (aguas residuales)	(540)	10 ng mL ⁻¹ (0-2000 ng mL ⁻¹)	4,4 (n=15) (0,1 µg L ⁻¹)	112			
Colorantes alimentarios (tartrazina, amarillo nº 6, rojo allura)	V	1,8·10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ 3,5·10 ⁻⁶ 1,4·10 ⁻⁶ (0- 2,0·10 ⁻⁴)	3 (n=10)	<42	4	2007	[140]

Tabla 5: Aplicaciones analíticas de la multiconmutación (continuación).

Analito (matriz)	Detector	Límite de detección (Intervalo de linealidad)	dsr (%) (n) (concentración)	Velocidad de muestreo (h ⁻¹)	Número de válvulas solenoides	Año	[Ref.]
Surfactantes aniónicos y catiónicos (aguas superficiales)	S (LEDs) 470 nm, 650 nm	0,06 mg L ⁻¹ (0.35 -10,5)	0,6 (n=11)	60	6	2007	[141]
Piroxicam (productos farmacéuticos)	A	1,0·10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ (0- 5,00·10 ⁻⁴)	<5 (n=10)	-	3	2007	[142]
Acido flufenámico (suero)	F (258/442 (λex/λem))	1,28 10 ⁻⁹ mol L ⁻¹ (5,33·10 ⁻¹⁰ -4,27·10 ⁻⁹)	0,9 (n=10) (5,33·10 ⁻⁸ mol L ⁻¹)	38	4	2007	[143]
(orina)		5,33 10 ⁻¹⁰ (7,11·10 ⁻⁸ -1,78·10 ⁻⁹)	1,2 (n=10) (7,11·10 ⁻⁹)	28			
Cloro (lejía)	S (LED) (515 nm)	4,5 mg L ⁻¹ (15-100)	2,5 (n=10) (25,0 mg L ⁻¹)	20	5	2007	[144]
Peroxido Hidrogeno (productos farmacéuticos)	QL	1,8 μmol L ⁻¹ (2,2-210)	0,8 (n=10) (1·10 ⁻⁵ mol L ⁻¹)	200	3	2007	[145]
Naproxeno	F (233/354 (λex/λem)) (299/407)	0,3 ng mL ⁻¹ (1-25)	2				
Ácido salicílico (suero, orina, productos farmacéuticos)		1,3 (5-200)	2 (n=10)	8	4	2007	[146]

Tabla 5: Aplicaciones analíticas de la multiconmutación (continuación).

Analito (matriz)	Detector	Límite de detección (Intervalo de linealidad)	dsr (%) (n) (concentración)	Velocidad de muestreo (h ⁻¹)	Número de válvulas solenoides	Año	[Ref.]
Turbidez agua	S (LEDs) (464 nm)	0,09 NTU(LED 464 nm) 0,1 NTU(LEDIR) (0-160 NTU) NTU (unidades de turbidez Nefelométrica)	1,6 (n=10) 40 NTU	60	2	2007	[147]
Ortofosfato (suelo, sedimentos)	S (690 nm) (530 nm)	0,02 mg L ⁻¹ (0-7)	2,5 (n=10) (1 mg L ⁻¹)	78	6	2007	[148]
Cianuro (agua natural)	F	0,5 µg L ⁻¹ (1-200)	1,4 (n=10)	22	5	2008	[149]
Acidez vinagre	NIR		0,05 (W/v)		3	2008	[150]
Taninos (berenjenas)	S (558 nm)	10 nmol L ⁻¹ (0-5,00 µmol L ⁻¹)	1 (n=10) (1,78 µmol L ⁻¹)	50	5	2008	[151]
Manganeso (suelos)	S (450nm)	0,2 mg L ⁻¹ (0,5-30)	5,6 (n=11) (5 mg L ⁻¹) 2,4 (n=11) (20 mg L ⁻¹)	45	3	2008	[152]
Glucosa (miel)	S (505 nm)	0,020 g L ⁻¹ (0-1)	3 (n=10)	90	3	2009	[153]
Cobre (turba)	FAAS	3 µg L ⁻¹ (16-100)	3,3 (n=20) (64 µg L ⁻¹)		6	2009	[154]
Ortofosfato (agua de rio y potable)	Fotometría	2,4 µg L ⁻¹ (10-800)	2 (n=7) (120 µg L ⁻¹)	20	3	2009	[155]
Cloro (agua)	S (438 nm)	9,4·10 ⁻⁸ mol L ⁻¹ (1,34·10 ⁻⁶ , 01·10 ⁻⁵)	1,0 (n=15)	45	3	2009	[156]

Tabla 5: Aplicaciones analíticas de la multiconmutación (continuación).

Analito (matriz)	Detector	Límite de detección (Intervalo de linealidad)	dsr (%) (n) (concentración)	Velocidad de muestreo (h ⁻¹)	Número de válvulas solenoides	Año	[Ref.]
Dióxido de azufre libre	S	0,3 mg L ⁻¹ (1,00-40,0)	1,8	25	6	2009	[157]
total (vino)		0,8 (25,0-250)	1,4	23			
Amonio	S (660 nm)	50 µg L ⁻¹ (0,17-5 mg L ⁻¹)	5 (n=10) (1-3 mg L ⁻¹)	30	5	2009	[158]
Cloramina (aguas residuales)		40 µg L ⁻¹ (0,5-14,5 mg L ⁻¹)	2 (n=10) (3-9 mg L ⁻¹)				
Acido aminosalicílico (productos farmacéuticos)	QL	0,30 µg L ⁻¹ (1,0-20)	3,4 (n=10) (10 µg mL ⁻¹)	17	4	2009	[159]
Paracetamol (productos farmacéuticos)	QL	1,8·10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ (5,0·10 ⁻⁶ , 0,10 ⁻⁵)	2,0 (n=10) (2·10 ⁻⁵ mol L ⁻¹) 1,2 (n=10) (4·10 ⁻⁵ mol L ⁻¹)	180	4	2009	[160]
Oxígeno disuelto (agua de mar)	S (466 nm)	(0- 16 mg L ⁻¹)	3	30	3	2010	[161]
Cloro (agua natural)	S (552 nm)	6,8 µg L ⁻¹ (10-100)	0,9 (n=20)	60	2	2010	[162]
Isótopos radiactivos ⁹⁰ Y ⁹⁰ Sr (muestras medioambientales)	ICP-AES	0,05 Bq 0,01 Bq	3 (n=5)	1,2 2	2	2010	[163]

Tabla 5: Aplicaciones analíticas de la multiconmutación (continuación).

Analito (matriz)	Detector	Límite de detección (Intervalo de linealidad)	dsr (%) (n) (concentración)	Velocidad de muestreo (h ⁻¹)	Número de válvulas solenoides	Año	[Ref.]
Colorantes azo-sulfonados	C	1,75 mg L ⁻¹	4 mg L ⁻¹ (n=10) 10	-	2	2010	[164]
Paladio (agua)	S (612 nm)	2,1 µg L ⁻¹ (0 - 4.0 mg L ⁻¹)	0,30 (n=5) (0.1 mg L ⁻¹)	44	4	2010	[165]
Cloro libre (agua)	A	(0,02- 4 mg L ⁻¹)			1	2010	[166]
Sulfasalazina Sulfanilamida Sulfametoxazol (productos farmacéuticos)	F (quenching de Tb (III) luminiscencia)	-	-	50	3	2010	[167]
Resveratrol (cerveza)	F (277/382 (λ _{ex} /λ _{em}))	1 ng mL ⁻¹ (3,3-100 ng mL ⁻¹)	3 (n=10)	-	3	2011	[168]
Resveratrol (vino)	F (257/382 (λ _{ex} /λ _{em}))	9,3 ng mL ⁻¹	-	-	5	2011	[169]
Amonio (agua de río, residual)	S (635 nm)	2,20 mg L ⁻¹ (5-50)	4,48 mg L ⁻¹ (n=10) (25)	11	10	2011	[170]
Uranio (muestras mediambientales)	S (660 nm)	1,9 ng (0-0,3 µg)	1,6 (n=10)	1,2-5,5	4	2011	[171]
Nitrito (aguas)	C	15 nM	0,5 µ mol L ⁻¹ (n=25) 0,5	2	1	2011	[172]
Bisfenol A (leche)	F (271/305 (λ _{ex} /λ _{em}))	0,6 ng mL ⁻¹	6 (n=10)	32	3	2012	[173]
Boro (plantas)	S (420 nm)	0,008 mg L ⁻¹		120	5	2012	[174]

Tabla 5: Aplicaciones analíticas de la multiconmutación (continuación).

Analito (matriz)	Detector	Límite de detección (Intervalo de linealidad)	dsr (%) (n) (concentración)	Velocidad de muestreo (h ⁻¹)	Número de válvulas solenoides	Año	[Ref.]
Fosfatasa alcalina (suero humano)	S (400 nm)	0,8 µg L ⁻¹ (- 150)	5,2 (n=6)	8-9	3	2012	[175]
Estroncio (muestras mediambientales)	ICP-OES (407 nm)	1,8 ng (0-500)	1,2 (n=10)		2	2012	[176]
Glicerol (biodiesel)	F (417/514 (λ _{ex} /λ _{em}))	0,036 mg L ⁻¹ (0,10-5)	1,5 mg L ⁻¹ (n=5) 3	14	6	2012	[177]
Cloruro (orina, agua natural)	S (254 nm)	0,7 mg L ⁻¹ (2-20)	1,6 (n=20) (10 mg L ⁻¹)	75	4	2013	[178]
Fósforo inorgánico Fósforo orgánico (cereales)	S (365 nm)	0,5 mg L ⁻¹ 2 mg L ⁻¹ (5-40)	1,2 3,6 (n=20) (20 mg L ⁻¹)	80	5	2013	[179]
Mercurio (arroz)	CV AFS (254 nm)	0,48 ng g ⁻¹ 1,61 (- 10 µg L ⁻¹)	3,28 (n=10) (3,63 ng g ⁻¹) 1,56 (n=10) (5,81 ng g ⁻¹)	-	1	2013	[180]
Ácido ascórbico (frutas)	S (628 nm)	4 µg L ⁻¹ (10-250 µg L ⁻¹)	2,7 (n=10) (5 µg L ⁻¹)	68	3	2013	[181]
Quinolonas (productos farmacéuticos)	S (310/588 (λ _{ex} /λ _{em}))	26 µmol L ⁻¹ (26-50)	3 (n=10) 200 µmol L ⁻¹	80	3	2013	[182]

Tabla 5: Aplicaciones analíticas de la multiconmutación (continuación).

Analito (matriz)	Detector	Límite de detección (Intervalo de linealidad)	dsr (%) (n) (concentración)	Velocidad de muestreo (h ⁻¹)	Número de válvulas solenoides	Año	[Ref.]
Cianuro (agua natural)	S (560 nm)	2 µg L ⁻¹ (5-200)	1,5 (n=10)	22	5	2013	[183]
Vitamina B12 (inyectables)	S (550 nm)	0,11-0,36 µg L ⁻¹	<2,2 (n=10)	72	5	2013	[184]
Aluminio (III)	S	3,97 µg L ⁻¹ (10-600)	1,5 (n=5)	137	5	2013	[185]
Cromo (IV) (agua)	(535 nm)	2,65 (10-300)	1,7 (n=5)	134			
Quinolonas (productos farmacéuticos)	F (310/588 (lex/lem))	50 µmol L ⁻¹ (165-1060)	2,2 (n=10) 200 µmol L ⁻¹	-	3	2013	[186]
Glicerol (biodiesel)	S (425 nm)	4 mg Kg ⁻¹ (0,001-100)	1,5 (n=3)	14	3	2013	[187]
Vitamina B ₁₂ (productos farmacéuticos)	QL	0,11 µg L ⁻¹	<2,2 (n=2)	72	5	2013	[188]
Al (III)	S	3,97 µg L ⁻¹ (10-600)	1,5	137	5	2013	[189]
Cr(VI) (agua)	(428 nm) (548 nm)	2,65 (10-300)	1,7 (n=5)				
Ciprofloxacino Dexametasona (productos farmaceuticos)	S (190 nm) (370 nm)	0,41 µg mL ⁻¹ (1,66-3,13) 0,014 (0,67-0,93)	4,88 2,20 (n=5)	10	5	2013	[190]

Tabla 5: Aplicaciones analíticas de la multiconmutación (continuación).

Analito (matriz)	Detector	Límite de detección (Intervalo de linealidad)	dsr (%) (n) (concentración)	Velocidad de muestreo (h ⁻¹)	Número de válvulas solenoides	Año	[Ref.]
I ₂ (biodiesel)	S (450 nm)	5g 100g ⁻¹	1,7 (n=10)	108	3	2014	[191]
Dicromato Ácido salicílico H ₂ O ₂ Starch (leche)	S (541 nm) (514) (441) (600)	0,12 mg L ⁻¹ (1-10,4) 2,58 (103,6-414,4) 6,14 (10-200) 0,29 (12,5-150)	2,33 2,16 1,12 0,85 (n=5)	75 80 92 86	6	2014	[192]
⁹⁹ Tc (agua, suelos)	ICP-MS	0,005 ng (0,016-108)	3,8 (n=5)	5	2	2014	[193]
Cd Pb (aguas)	V	0,6 µg L ⁻¹ (6,3-75,6) 0,10 (320-38,4)	4,1 2,9 (n=5)	13	2	2014	[194]
Proteínas (fluidos biológicos)	T (565/600 nm)	65 mg L ⁻¹ (72-900 mg L ⁻¹)	3 (n=5)	30	3	2014	[195]

Tabla 5: Aplicaciones analíticas de la multiconmutación (continuación).

Analito (matriz)	Detector	Límite de detección (Intervalo de linealidad)	dsr (%) (n) (concentración)	Velocidad de muestreo (h ⁻¹)	Número de válvulas solenoides	Año	[Ref.]
Cr (IV) Ácido salicílico H ₂ O ₂ Almidón (leche)	S (541 nm)	0,12 (1-10,4)	2,33 2,16 1,12 0,85	75 80 92 86	6	2014	[196]
		2,58 (103,6-404,4)					
		6,14 (10,0-200,0)					
		0,29 (12,5-150,0)					

A: Amperometría. **AAS**: Espectrofotometría de Absorción Atómica. **AFS**: Espectrometría de Fluorescencia Atómica. **ATR FTIR**: Reflectancia Atenuada del Infrarrojo mediante Transformada de Fourier. C: Conductimetría. **ENS**: Sensor Electrónico para la determinación de Gases. **ET AAS**: Espectrometría de Absorción Atómica con Atomización Electrónica. **ET ICP MS**: Espectrometría de Masas acoplada a Espectroscopia de Emisión de Plasma Acoplado Inductivamente. F: Fluorescencia. **FAAS**: Espectrometría de Absorción Atómica con Llama. **HG AFS**: Espectrometría de Absorción Atómica por Generación de Hidruros. **HPLC**: Cromatografía Líquida de Alta Resolución. **ICP -AES**: Espectrometría de Emisión Atómica con Plasma Acoplado Inductivamente. **ICP-OES**: Espectroscopia de Emisión Óptica con Plasma Acoplado Inductivamente. **ISE**: Electrodo Selectivo de Iones. **PSVI**: Instrumento portátil para Voltamperometría de Redisolución. **QL**: Quimioluminiscencia. **S**: Espectrofotometría. **T**: Turbidimetría. **V**: Voltamperometría.

Tabla 6. Aplicaciones analíticas de la multiconmutación en la determinación de pesticidas.

Analito (Matriz)	Detector	Límite de detección (Intervalo de linealidad)	dsr (%) (n) (concentración)	Velocidad de muestreo (h ⁻¹)	Número de válvulas solenoides.	Año	[Ref.]
Carbaril (pesticidas)	S (596 nm)	(26 µg L ⁻¹)	0,5 (5,8 ppm)	70/50	5	1999	[197]
Asulam (agua)	QL	40 µg L ⁻¹ (0-5,0 mg L ⁻¹)	4,1 (0,5 mg L ⁻¹) 5,8 (2)	30	3	2004	[198]
Aldicarb (formulaciones técnicas, aguas)	QL	0,069 µg L ⁻¹ (2,2-100)	3,7 (n=20) 24 µg L ⁻¹	17	3	2004	[199]
Difenilamina (frutas)	F (291/372 (lex/lem))	0,06 mg Kg ⁻¹ (0,25-5)	<3	-	3	2005	[200]
Acetazolamida	S 570 nm	0,2 mmol L ⁻¹ (1-10)	0,7 (n=10) (4 mmol L ⁻¹)	22	3	2005	[201]
Propanil (agua rio, residual, subterránea, mineral)	QL	8 µg L ⁻¹ (10 µg L ⁻¹ - 5 mg L ⁻¹)	1,2 (n=17)	20	3	2006	[202]
Fuberidazol o-fenilfenol (agua)	F (314/356 (lex/lem)) (250/345)	0,18 ng mL ⁻¹ 6,1	-	12	4	2006	[203]
Tiabendazol (cítricos)	F (305/345 lex/lem))	0,09 mg Kg ⁻¹ (0,3-10)	2	-	4	2006	[204]

Tabla 6: Aplicaciones analíticas de la multiconmutación en la determinación de pesticidas (continuación).

Analito (Matriz)	Detector	Límite de detección (Intervalo de linealidad)	dsr (%) (n) (concentración)	Velocidad de muestreo (h ⁻¹)	Número de válvulas solenoides.	Año	[Ref.]
Hexitiazox (formulaciones de pesticidas)	NIR-FTIR (4984,6-4767,3 cm ⁻¹)	0,1 µg L ⁻¹	0,8 (n=3)	52	2	2006	[205]
Carbaril (agua natural)	QL	11 µg L ⁻¹ (25-700)	1,3 (n=20)	72	5	2007	[206]
Nicotina (tabaco)	NIR-FTIR (1334-1300 cm ⁻¹)	0,05 mg mL ⁻¹ (0,2-5)	2,5	12	6	2007	[207]
Karbutilato (agua, orina)	QL	(10 µg L ⁻¹) (0,1 µg L ⁻¹ - 65 mg L ⁻¹)	3,6 (n=5) (0.1 mg L ⁻¹)	17	3	2007	[208]
Estricnina (agua mineral, orina)	QL	2 µg L ⁻¹ 25 µg L ⁻¹ - 20 mg L ⁻¹	3,2	15	3	2007	[209]
Fluometurón (orina, suelos, agua formulaciones)	F (247/325 (λex/λem))	(0,01-4 mg L ⁻¹)	1,7	-	2	2007	[210]
Difenamida (pesticidas)	QL	1 mg L ⁻¹ (0- 5,0)	4,3 (n=20)	20	3	2007	[211]
Acroleína (diferentes muestras)	QL	0,1 µg L ⁻¹ (5-100)	-	52	3	2007	[212]
Benfuresato (agua, orina)	QL	0,1 µg L ⁻¹ (1 µg L ⁻¹ - 4 mg L ⁻¹)	3,9 (N=5)	22	3	2008	[213]
Buminafos (agua, suelos)	QL	0,005 mg L ⁻¹ (0,01-1)	3 (n=20)	48	3	2008	[214]
Flumetsulam (agua, suelo)	F (247/325 (λex/λem))	0,02 mg L ⁻¹ (0.01-1) 0,01	1,8	4	4	2009	[215]
Carbaril (aguas naturales)	S (585 nm)	1,7 µg L ⁻¹ (5-200)	0,7 (n=20)	55	2	2010	[216]
Carbaril (residuos vegetales)	S (585 nm)	1 mg Kg ⁻¹	4	-	4	2012	[217]

QL: Quimioluminiscencia. F: Fluorescencia. NIR-FITR: Espectroscopía Infrarroja con Transformadas de Fourier. S: Espectrofotometría

1.2.3. Multibombeo en sistemas de flujo

Los sistemas de flujo por multiconmutación (SFMC) que hacen uso de válvulas solenoides, pueden incrementar sus prestaciones analíticas combinándose con la modalidad de flujo de multibombeo (*multipumping*).

Los sistemas de flujo por multibombeo (SFMB) se basan en el uso de microbombas solenoides, las cuales actúan a la vez como dispositivo para el bombeo de los fluidos que circulan por las distintas líneas del montaje de flujo, y también como válvula de conmutación. Desde la primera reseña en que se evaluaban aspectos operativos asociados al empleo de bombas solenoides en FIA, para reemplazar a la ya clásica bomba peristáltica [218], se han desarrollado muchas aplicaciones que han puesto de manifiesto el potencial analítico de esta reciente modalidad de flujo. [219]

En estos dispositivos solenoides, el flujo está aislado del mecanismo de funcionamiento por un diafragma flexible. Cuando se activa el solenoide (figura 26), el diafragma se retrae creando un vacío parcial dentro del cuerpo de la bomba. El fluido se dispensa por la bomba cuando el voltaje desciende lo suficiente para que el muelle interno conduzca nuevamente el diagrama a la posición de cerrado. La repetición del ciclo genera un flujo pulsante que facilita el mezclado de muestra y reactivos.

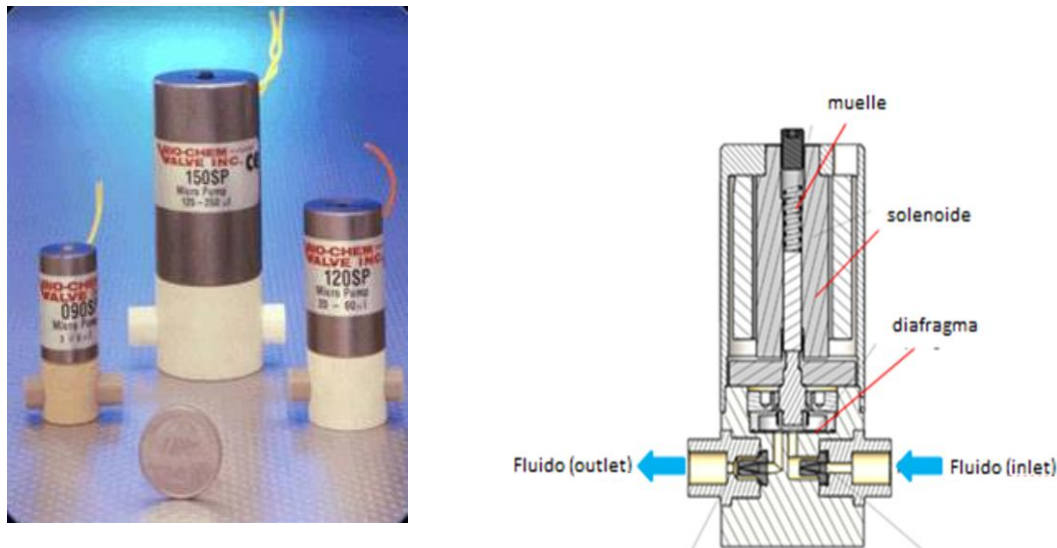


Figura 26. Aspecto y esquema interno de una bomba solenoide.
(<http://www.biochemfluidics.com/>)

El caudal de impulsión de la bomba viene determinado por la frecuencia de pulsos y el volumen bombeado con cada pulso. Las microbombas vienen calibradas de fábrica de manera que por cada pulso se dispensa un volumen prefijado de líquido (8, 20, 25, 50 μL ,...). Otro aspecto importante a considerar es que las partes de la microbomba que están en contacto con la solución están fabricadas con teflón (PTFE) o PEEK, por lo que gozan de una gran resistencia química.

Se podría pensar que un flujo pulsante resulta ser un serio inconveniente; no obstante, se han observado excelentes reproducibilidades con frecuencias de trabajo incluso inferiores a 1 Hz [220].

La combinación de estas dos modalidades de flujo (multiconmutación y multibombeo) permite el diseño de *sistemas* miniaturizados para el análisis de flujo (*miniaturised flow networks*) basada en una estrategia de medida de tiempos de

pulsos, lo que facilita la sincronización en el proceso de mezclado de muestra y reactivos. El resultado es un sistema versátil completamente automatizado, fácil de reconfigurar a través del software. Por otra parte, el bajo consumo de energía, la excelente relación costo-eficacia, la precisión, la exactitud y la robustez asociada a los dispositivos solenoides, sugieren que la miniaturización de los sistemas de flujo basados en estas metodologías puede utilizarse ventajosamente para satisfacer los requisitos exigibles en el desarrollo de instrumentos portátiles para análisis *in situ*.

1.2.3.1. Aplicaciones del análisis por multibombeo

La mayoría de las aplicaciones se han limitado a la espectrofotometría y la quimioluminiscencia, las técnicas de detección más utilizadas (ver tabla 7).

Tabla 7. Aplicaciones analíticas del análisis por multibombeo.

Analito (Matriz)	Detector	Límite de detección (Intervalo de linealidad)	dsr (%) (N) (concentración)	Velocidad de muestreo (h ⁻¹)	Año	[Ref.]
Indapamida (productos farmacéuticos)	S (601 nm)	1mg L ⁻¹	2.1	25	2002	[221]
Trimipramina (productos farmacéuticos)	S (620 nm)	1.15 mg L ⁻¹	4.7	50	2002	[222]
Pirazinamida (productos farmacéuticos)	QL	5.79 mg L ⁻¹	<0.99 (n=21)	150	2002	[223]
Ácido fítico (extractos de plantas)	S (525 nm)	1 mg L ⁻¹ (5-100)	<1	150	2002	[224]
Diazepam (bebidas alcohólicas)	F (272/450 (lex/lem))	2.02 mg L ⁻¹	(1.97 – 2.05)		2003	[225]
Bromohexina (productos farmacéuticos)	S (550 nm)	2 mg L ⁻¹ (hasta 400)	<1,5 (n=10)	45	2003	[226]
Dipirona (productos farmacéuticos)	S (430 nm)	1 mg L ⁻¹ (10-400)	<0,12 (n=20)	50	2003	[227]
Tiocianato (saliva)	S (480nm)	50 mmol L ⁻¹ (0.5-10)	1.0	60	2003	[228]
Diazepam (productos farmacéuticos)	F (272/450 (lex/lem))	0.97 mg L ⁻¹ (Hasta 40)	(2,09-2,13)	-	2003	[229]
Arsénico (sustancia test)	AFS	0.02 µg g ⁻¹ (0.05-2.5)	2 (n=10) (1 µg g ⁻¹)	45-102	2003	[230]

Tabla 7: Aplicaciones analíticas del análisis por multibombeo (continuación).

Analito (Matriz)	Detector	Límite de detección (Intervalo de linealidad)	dsr (%) (N) (concentración)	Velocidad de muestreo (h ⁻¹)	Año	[Ref.]
Buspirona (productos farmacéuticos)	F (760 nm)	2.8 mg L ⁻¹ (Hasta 60)	-	55	2003	[231]
Trolox Ácido ascórbico Resveratrol (productos farmacéuticos)	QL	Hasta 3.2 · 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ -2310 ⁻⁵ M Hasta 1.1·10 ⁻³ -5,7·10 ⁻⁵ M Hasta 8,8·10 ⁻⁸ con luminol y lucigenina	(0.2 – 2) (n=10)	70-160	2004	[232]
Melatonina Triptófano 5-Hidroxitriptófano	QL	-	<2 (n=10)	39-140	2004	[233]
Titanio (aguas naturales protectores solares) sedimentos de lago)	S (425 nm)	0,4 µg L ⁻¹ (hasta 100)	-	46	2004	[234]
Ác. Grasos volátiles	F (335/398 (λ _{ex} /λ _{em}))	5,1 mg L ⁻¹ (19-1000)	-	-	2004	[235]
Nitrito (agua subterránea)	QL	-	-	-	2004	[236]
Gabapentina (productos farmacéuticos)	QL	40 mol L ⁻¹ (60-350)	<2	41	2004	[237]
Azúcares reductores (melaza)	S (420 nm)	(0,05-0,5%)(w/v)	<0,013	65	2004	[238]
Sulfato Cloruro (aguas naturales)	T (410/800 (λ _{ex} /λ _{em}))	1.3 mg L ⁻¹ 0,7 mg L ⁻¹	-	10	2004	[239]
Uranio (VI) (muestras ambientales)	S (660 nm)	12,6 ng L ⁻¹	5	-	2004	[240]

Tabla 7: Aplicaciones analíticas del análisis por multibombeo (continuación).

Analito (Matriz)	Detector	Límite de detección (Intervalo de linealidad)	dsr (%) (N) (concentración)	Velocidad de muestreo (h ⁻¹)	Año	[Ref.]
Ciprofloxacino Norfloxacino (productos farmacéuticos)	S (275nm) (278 nm)	0,99 mg L ⁻¹ 0,27 (5 a 70)	<2 (n=10)	-	2004	[241]
Benserazida Levodopa (productos farmacéuticos)	QL	(2,5-20 mg L ⁻¹) (5-30)	-	-	2005	[242]
Carvelidol (productos farmacéuticos)	QL	8,7·10 ⁻⁹ mol L ⁻¹ (1,2·10 ⁻⁷ - 3·10 ⁻⁶)	< 1,3 (n=10)	65	2005	[243]
Metformín (productos farmacéuticos)	QL	0,94 mg L ⁻¹ (5-15)	2 (N=5)	95	2005	[244]
Ambroxol (productos farmacéuticos)	S (413 nm)	(10-200 mg L ⁻¹)	<0.5 (n=15)	60	2005	[245]
Glucosa Fructosa (jarabe de azúcar)	S (410 nm)	-	<2	50	2005	[246]
Ác. fenilglioxílico (orina)	S (254 nm)	37 mg L ⁻¹ (hasta 700)	<5 (n=10)	43	2005	[247]
Fenoles (agua)	S (700 nm)	13 ng mL ⁻¹ (50–3,500)	0,5 (n=10) (1,0 µg mL ⁻¹)	65	2005	[248]

Tabla 7: Aplicaciones analíticas del análisis por multibombeo (continuación).

Analito (Matriz)	Detector	Límite de detección (Intervalo de linealidad)	dsr (%) (N) (concentración)	Velocidad de muestreo (h ⁻¹)	Año	[Ref.]
Tensioactivos catiónicos (aguas superficiales)	S (650 nm)	0,035 mg L ⁻¹ (0,34-10,2)	0,6 (n=11)	72	2006	[249]
Ortofosfato	S (254 nm)	0,08 mg L ⁻¹ (hasta 20)	0,6	75	2006	[250]
Fosforo orgánico (aguas residuales)		0,5 (hasta 40)	2,3	11		
Ác. Ascórbico (zumos)	QL	0,17 mmol L ⁻¹	<1 (n=11)	100	2006	[251]
Cobre (suero, orina)	AAS (357,9 nm)	0,035 mg L ⁻¹ (Hasta 5)	2,54 (n=10)	360	2006	[252]
		0,67 (hasta 300)	8,11 (n=10)	12		
Nitrito (aliento condensado)	C (540 nm)	3,8 ng mL ⁻¹ (0-500)	0,7 (n=9) (300 ng mL ⁻¹)	144	2006	[253]
Captopril (productos farmacéuticos)	S (350 nm)	(10-60 µg L ⁻¹)	(1,81-4,48)	100	2007	[254]
Cr(III) Cr(IV) (aguas)	S (LEDs) (548 nm)	2,05 µg L ⁻¹ 1 (10-200)	<2 (n=20)	67 105	2007	[255]
Hierro(II) Cobalto (II) Manganeso (II) (alimentos para animales)	QL	0,5 nmol 0,24 375	-	-	2007	[256]

Tabla 7: Aplicaciones analíticas del análisis por multibombeo (continuación).

Analito (Matriz)	Detector	Límite de detección (Intervalo de linealidad)	dsr (%) (N) (concentración)	Velocidad de muestreo (h ⁻¹)	Año	[Ref.]
Amonio (aguas naturales)	QL	0,02 mg L ⁻¹ (0,3-5)	<1,2 (n=10)	50	2007	[257]
Fluoxetina (productos farmacéuticos)	QL	0,31 mg L ⁻¹ (hasta 10)	<2 (n=10)	136	2007	[258]
Nitrito (aguas naturales)	S (350 nm)	8 µg L ⁻¹ (0-1,0 mg L ⁻¹)	0,8 (n=20)	108	2007	[259]
		25 µg L ⁻¹ (0- 2,0 mg L ⁻¹)	0,6 (n=20)	44		
Taninos (bebidas)	S (700 nm)	0,3 mg L ⁻¹ (2-100)	1,1 (n=10)	75	2008	[260]
Paraquat (aguas naturales)	S (254nm)	22 µg L ⁻¹ (0,10-5,0 mg L ⁻¹)	1 (n=10) (22 µg L ⁻¹)	63	2008	[261]
Nitrito	S (540/700 nm)	0,013 mg L ⁻¹ (0,026-5)	0,5	55	2008	[262]
Nitrato (agua)		0,039 (0,039-7)	1,5	27		
Sulfato (agua)	T (710 nm)	3 mg L ⁻¹ (20-200)	2,4 (n=20)	33	2008	[263]
Selenio (agua natural)	S LED (530 nm)	0,004 mg L ⁻¹ (0,010-0,500)	1,6 (n=4) (0,05 mg L ⁻¹)	23	2009	[264]
Ácido úrico (orina)	S (562 nm)	3,0 µmol L ⁻¹ (10-100)	1,2	150	2010	[265]
Cloro libre (agua natural)	S (552 nm)	6,8 µg L ⁻¹ (10-100)	0,9 (n=20)	-	2010	[162]
Glicerol (biodiesel)	S (412 nm)	mg L ⁻¹ (5-50)	1,5 (n=10)	34	2010	[266]

Tabla 7: Aplicaciones analíticas del análisis por multibombeo (continuación).

Analito (Matriz)	Detector	Límite de detección (Intervalo de linealidad)	dsr (%) (N) (concentración)	Velocidad de muestreo (h ⁻¹)	Año	[Ref.]
Carbaril (agua natural)	S (585 nm)	1,7 µg L ⁻¹ (5-200)	0,7 (n=20)	50	2010	[267]
Iodato (sal de mesa)	S (552 nm)	17 µg L ⁻¹	0,9 µg L ⁻¹ (n=11)	117	2010	[268]
Plomo (muestras biológicas)	FAAS	5,27 ng mL ⁻¹ (7,5 ng mL ⁻¹ -3,5 µg mL ⁻¹)	1,6 (n=8)	-	2011	[269]
Manganeso (agua natural)	S (490 nm)	6 µg mL ⁻¹ (25-1500)	2,6 (n=10)	-	2011	[270]
Glicacida (productos farmacéuticos)	QL	2,9 mg L ⁻¹ 6,3 (18-100)	1,41 1,68	150	2011	[271]
Amonio (agua de mar)	F (365/425 λex/λem))	13 nmol L ⁻¹	3 (n=10)	32	2011	[272]
Glifosato (aguas)	S (495 nm)	0,17 µg mL ⁻¹ 0,53 (0.5- 10)	6,4 (n=10) (4 µg mL ⁻¹)	-	2011	[273]
N-acetilcisteina (productos farmacéuticos)	F (350/522-524 λex/λem))	1,6 µmol L ⁻¹ (50-750)	1,6 (n=5)	75	2012	[274]
Cianuro (agua natural)	S (560 nm)	µg L ⁻¹ (5-200)	1,5 (n=10)	22	2013	[183]
Fósforo inorgánico	S (254 nm)	0,5 mg L ⁻¹ (5-40)	1,2 (n=20)	80	2013	[179]
Fósforo orgánico (cereales)	S (365 nm)	1,2 (5-40)	3,6 (n=20)			
Diazepam (bebidas)	V	1,8 µg mL ⁻¹ (0-285)	7,4 (7,1 µg mL ⁻¹)	65	2013	[275]

Tabla 7: Aplicaciones analíticas del análisis por multibombeo (continuación).

Analito (Matriz)	Detector	Límite de detección (Intervalo de linealidad)	dsr (%) (N) (concentración)	Velocidad de muestreo (h ⁻¹)	Año	[Ref.]
Quinolonas (productos farmacéuticos)	F (310/588 $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$)	26 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (100-770)	3 (n=10)	38	2013	[182]
Ketoprofeno (productos farmacéuticos)	F (330/401 $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$)	1,45 mg L^{-1} (0-50)	-3,2-2,2		2013	[276]
C NH ₄ ⁺ (agua mineral)	C	50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (0,08-9.0 mmol L^{-1}) 0,27 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (0,5-25 mol L^{-1})	<1	15	2014	[277]
Proteínas (fluidos biológicos)	T (565/600 nm)	65 mg L^{-1} (72-900 mg L^{-1})	3 (n=5)	30	2014	[195]
Cr (IV) Ác. Salicílico H ₂ O ₂ Almidón (leche)	S (541 nm) (514 nm) (441 nm) (600 nm)	0,12 (1-10,4) 2,58 (103,6-404,4) 6,14 (10,0-200,0) 0,29 (12,5-150,0)	2,33 2,16 1,12 0,85	75 80 92 86	2014	[196]

AAS: Espectrofotometría de Absorción Atómica. AFS: Espectrometría de Fluorescencia Atómica. C: Conductimetría. QL: Quimioluminiscencia. F: Fluorescencia. S: Espectrofotometría. T: Turbidimetría. V: Voltamperometría.

1.2.4. Aportaciones científicas más relevantes a la multiconmutación y al multibombeo

En el estudio de la multiconmutación y multibombeo, dentro del ámbito internacional, es de destacar el grupo investigador radicado en el *Centro de Energía Nuclear na Agricultura* de la Universidad de Sao Paulo, Piracicaba (Brasil); y el grupo de J.L.M. Santos y J.L.F.C. Lima, en el departamento de Ciencias Químicas de la Facultad de Farmacia en la Universidad de Porto (Portugal), habiendo trabajado estos dos grupos en estrecha colaboración en el ámbito del multi-bombeo. Estos grupos de trabajo, pioneros en estas modalidades del análisis en flujo continuo, han publicado distintos trabajos, muchos de ellos en colaboración, sobre sus fundamentos y también de revisión, los cuales constituyen referencias clásicas obligadas: "*Multicommutation in flow analysis. Part 1. Binary sampling: concepts, instrumentation and spectrophotometric determination of iron in plant digests*" (1994) [61]; "*Evolution of the commutation concept associated with the development of flow analysis*", (1999) [278]; "*Multicommutation in flow analysis: concepts, applications and trends*", (2002) [279]; "*Multi-pumping in flow analysis: concepts, instrumentation and potentialities*" (2002) [280]; "*Sampling Strategies Exploiting Multi-pumping Flow Systems*" (2003) [281]; "*Multi-pumping Flow Systems: an Automation Tool*" (2004) [282]; "*A Multi-purpose Flow System Based on Multi-commutation*" (2006) [283]; "*Multi-pumping Flow Systems: The Potential of Simplicity*" (2007) [284]; "*A critical comparison of analytical flow systems exploiting streamlined and pulsed flows*" (2007) [285]; "*Multi-commutation in flow analysis: Recent developments and applications*" (2008) [286];

“Evidences of Turbulent Mixing in Multi-pumping Flow Systems” (2009) [287]; *“Multi-commutation in spectrometry”* (2009) [288].

En el plano nacional, si bien son varios los grupos que vienen desarrollando desde hace años una investigación en el campo del análisis por inyección en flujo, es de destacar el Departamento de Química de la Universidad de Baleares, y especialmente el grupo dirigido por V. Cerdá: *“Flow techniques in water analysis”* (1999) [289]; *“Application of flowing stream techniques to water analysis. Part I. Ionic species: dissolved inorganic carbon, nutrients and related compounds”* (2003) [290]; *“Application of flowing stream techniques to water analysis. Part II. General quality parameters and anionic compounds: halogenated, sulphur and metalloid species”* (2004) [291]; *“Application of flowing stream techniques to water analysis. Part III. Metal ions: alkaline and alkaline earth metals, elemental and harmful transition metals, and multielemental analysis”* (2004) [292]; *“Multicommutated Flow Techniques for Developing Analytical Methods”* (2006) [293].

En los mencionados trabajos se dejan entrever las enormes posibilidades que esta nueva modalidad de análisis presenta.

La figura 27, muestra el número de publicaciones aparecidas en revistas indexadas desde la aparición de los conceptos (primera publicación) de multiconmutación y multibombeo. Se destaca la reciente incorporación de la metodología multi-bombeo (año 2002) al análisis de flujo, así como el escaso número

de publicaciones recogidas en revistas internacionales indexadas para ambas modalidades de flujo.

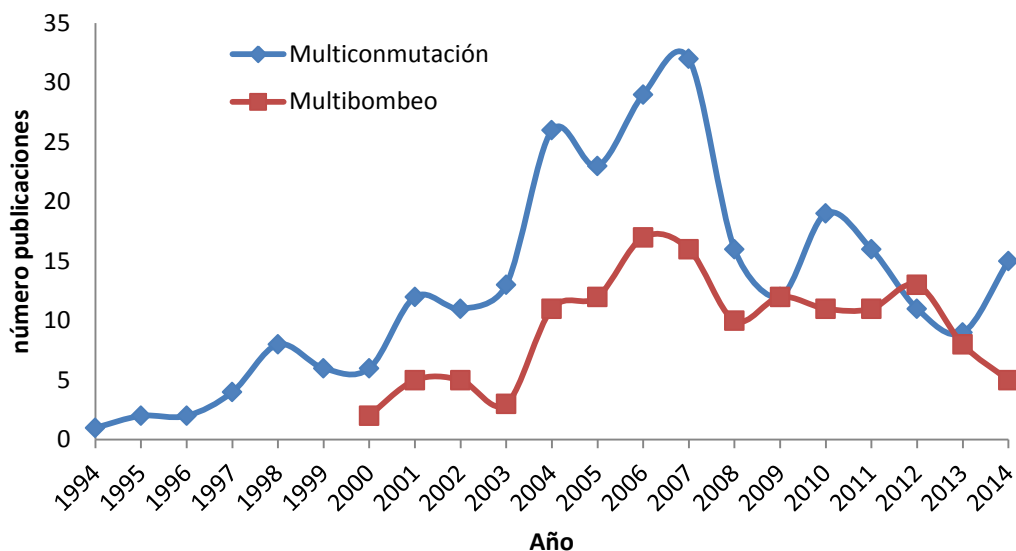


Figura 27. Número de trabajos publicados de multiconmutación y multibombeo.
(Fuente: Web of Science, Analytical Chemistry category)

Una evidencia más relacionada sobre la novedad del multibombeo como metodología de flujo la proporciona el elevado número de artículos (18% del total de los publicados) que abordan distintos aspectos fundamentales tales como: el régimen del flujo producido por las microbombas, los perfiles de mezclado y dispersión, las posibles estrategias de muestreo, las configuraciones más favorables de dispositivos solenoide, o el potencial analítico de la propia metodología. Estos estudios sugieren que se trata de una metodología en un estado incipiente, cuyos fundamentos todavía están bajo estudio, y donde cabe esperar una importante expansión en cuanto a sus aplicaciones y acoplamiento con distintos sistemas de detección.

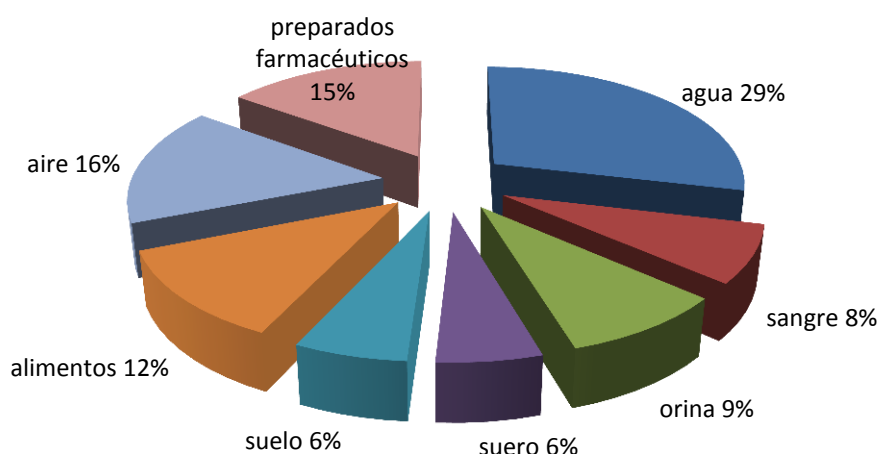


Figura 28. Porcentaje de artículos publicados sobre multibombeo para distintas matrices.
(Fuente: Web of Science, Analytical Chemistry category)

Los sistemas de flujo basados en multibombeo se han aplicado preferentemente al análisis de agua (29%), el análisis aire (16%), preparados farmacéuticos (15%), alimentos (12%) y los análisis clínicos de orina (9%) y suero (6%), y muestras medioambientales tales como suelos (6%) (figura 28).

Por lo que respecta a los detectores empleados en combinación con las microbombas solenoides, la espectroscopía es la técnica más utilizada con un 54% de los artículos publicados (figura 29). Destacan también las técnicas luminiscentes, entre ellas, especialmente la quimioluminiscencia (21%), y la detección fluorimétrica (15%). El flujo turbulento debido a los pulsos de las bombas solenoides provoca un eficiente y rápido mezclado de muestra y reactivos, lo cual es imprescindible en las reacciones quimioluminiscencia donde la desactivación por emisión de radiación obedece normalmente a cinéticas muy rápidas.

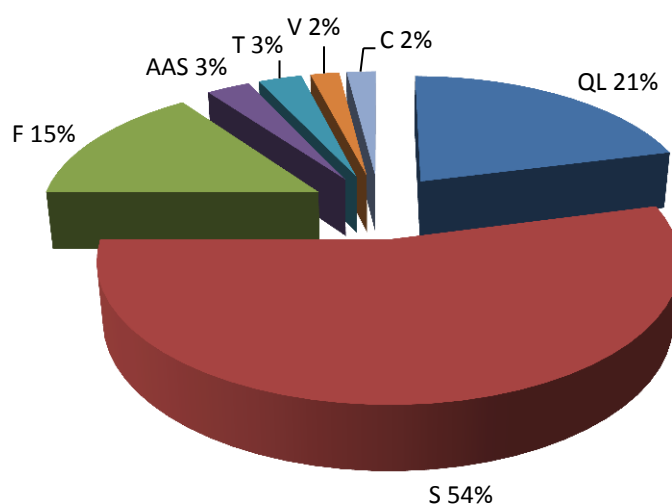


Figura 29. Porcentaje de artículos publicados sobre multibombeo para distintos detectores.
(Fuente: Web of Science, Analytical Chemistry category)

El flujo pulsante contribuye a estabilizar las partículas en suspensión y permite obtener una excelente reproducibilidad en el análisis turbidimétrico (*“An expert flow system involving in-line prior assay for turbidimetric determination of chloride and sulphate in natural waters”*, (2008) [239]). Sin embargo, la naturaleza del flujo parece haber limitado la implementación en las técnicas electroanalíticas y las técnicas de espectrometría atómica.

Finalmente, la combinación de la multiconmutación y el multibombeo, debido a la posibilidad de miniaturización, comporta un escaso consumo de reactivos y genera pocos desechos, presentándose como una metodología limpia (*“Flow analysis strategies to greener analytical chemistry (GAC). An overview”* (2001) [294]).

1.3. Quimioluminiscencia y técnicas en flujo continuo

El uso analítico de la quimioluminiscencia está experimentando un creciente interés, ya que representa una alternativa simple, barata y sensible para cuantificar una gran variedad de compuestos. Desde hace unos treinta años, el fenómeno de la luminiscencia (originalmente una curiosidad del laboratorio físico), se ha convertido en una rama de la espectrometría aplicada, dentro de la Química Analítica. Debido a la nueva instrumentación y, especialmente, a la incorporación de técnicas modernas, algunas nuevas y otras tomadas de otras disciplinas, la quimioluminiscencia y la bioluminiscencia se aplican de forma rutinaria en el análisis tanto cualitativo como cuantitativo.

Aunque el fenómeno de la quimioluminiscencia se conoce desde 300 años a.C., el desarrollo de aplicaciones analíticas es relativamente reciente. Debido a su alta sensibilidad, los métodos basados en detecciones quimioluminiscentes suponen una herramienta analítica de gran utilidad. La primera aplicación de la quimioluminiscencia como técnica analítica la llevó a cabo Erdey en 1957, que estudió el uso de varias sustancias, como luminol, lofina y lucigenina, como indicadores volumétricos.

La quimioluminiscencia puede medirse utilizando configuraciones en flujo, la mas simple es el FIA, donde los reactivos son bombeados por diferentes canales y medidos *in situ* en la celda de detección. En algunos montajes, en unos de los canales se puede introducir una cantidad discreta de muestra, en otros casos la muestra es continuamente bombeada hasta la celda de detección.

Si bien las investigaciones sobre el potencial analítico de la quimioluminiscencia para análisis de rutina datan de los años 70 para las reacciones en fase gaseosa, y de la década de los 80 para las reacciones en fase líquida, la detección quimioluminiscente es una técnica en pleno desarrollo. El interés de la quimioluminiscencia en Química Analítica, queda reflejado en el número de publicaciones científicas en revistas de gran prestigio (*Analytical Chemistry*, *Analytica Chimica Acta*, *The Analyst*, *Talanta*, *Journal of Chromatography* y *Journal of pharmaceutical, Biomedical Analysis*, entre otras), y por la aparición de revistas específicas: *Journal of Luminescence*, *Journal of Biological and Chemical Luminescence*, *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence*. La figura 30 muestra la evolución de las publicaciones en revistas internacionales indexadas (*Web of Science*) en los últimos 15 años.

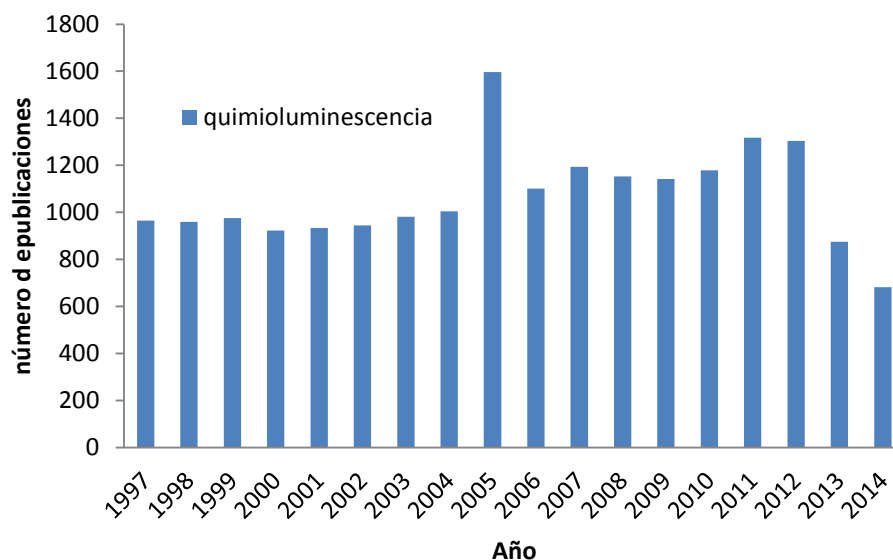


Figura 30. Número de publicaciones sobre quimioluminiscencia.
(Fuente: Web of Science)

La importancia de las determinaciones quimioluminiscentes en el campo de la Química Analítica, ha tenido una evolución creciente en los últimos años. Durante los

años 70 y 80, la investigación en este tipo de reacciones estaba orientada a la búsqueda de nuevos reactivos quimioluminiscentes [295-297] y el estudio de reactivos estructuralmente semejantes a los que ya se conocían como quimioluminiscentes.

A partir de los años 90 y hasta la actualidad, los estudios de reacciones quimioluminiscentes se han dirigido más hacia la mejora en la instrumentación, construyendo detectores muy sencillos para este tipo de medidas [298-300], y también a la obtención de estos sistemas de detección acoplados a técnicas separativas como HPLC y electroforesis capilar [301], permitiendo la resolución y cuantificación de varios analitos en mezclas complejas.

Existen grupos de investigación reconocidos en un gran número de países, lo cual es indicativo de la difusión e interés analítico asociado a la detección quimioluminiscente: W.R.G. Baeyens (Department of Pharmaceutical Analysis, Ghent University, Ghent, Bélgica); J.W.Birks (Department of Chemistry and Biochemistry and Cooperative Institute for Research in Environmental Sciences, University Colorado, Boulder, Colorado, USA); A. Twonshend (profesor emérito en el Department of Chemistry, Faculty of Sciences, University of Hull, UK); A.C. Calokerinos, Laboratory of Analytical Chemistry, Department of Analytical Chemistry, University of Athens, Grecia). Las adscripciones de estos investigadores, referencias internacionales, pone de manifiesto la amplitud de áreas donde la quimioluminiscencia encuentra aplicación analítica: análisis de fármacos, bioquímicos, medioambiental, etc. En España, es de destacar el grupo de A. M. García Campaña radicado en el Departamento de Química Analítica de la Universidad de Granada.

1.3.1. Fundamento y mecanismos de las reacciones quimioluminiscentes

La quimioluminiscencia se define como la emisión de radiación electromagnética, normalmente en la región del visible o infrarrojo cercano, producida por una reacción química. Para que se dé la quimioluminiscencia es necesario que la reacción produzca un exceso de energía, lo cual es bastante frecuente sobretodo en reacciones rédox, pero el hecho de que este exceso de energía se disipe con emisión quimioluminiscente, depende en gran medida de la estructura molecular de los intermedios o productos de reacción [302].

En este sentido, la detección quimioluminescente presenta algunas características de un detector ideal:

- Como la *intensidad de emisión es función de la concentración de las especies químicas implicadas en la reacción QL*, las medidas de la intensidad de emisión pueden emplearse con fines analíticos.
- *Elevada sensibilidad y amplio intervalo dinámico de concentraciones*, llegando en algunos casos a límites de detección del orden de los femtomoles. Esto último es posible gracias a que la quimioluminiscencia se comporta como una técnica de “campo oscuro” lo que comporta una ausencia de niveles altos de radiación de fondo.
- *No requiere fuente de excitación externa*, lo que se traduce en ausencia de dispersión y de señales de fondo, en la reducción de interferencias debidas a

procesos de excitación no selectivos y en la utilización de una instrumentación más sencilla que otros procesos luminiscentes.

- *Versatilidad*, se puede utilizar la técnica para determinar cualquiera de las especies que participan en el proceso quimioluminiscente: sustratos, catalizadores, inhibidores, fluoróforos, especies que dan reacciones acopladas aumentando o disminuyendo la concentración de los reactivos implicados en la reacción quimioluminiscente.
- *Acoplamiento fácil* como método de detección en técnicas cromatográficas, electroforesis capilar e inmunoensayo.

No obstante deben considerarse algunas limitaciones en el análisis por QL, como la dependencia de la emisión quimioluminiscente de varios factores ambientales que deben ser controlados, la falta de selectividad, ya que un reactivo quimioluminiscente no se limita a un único analito, y finalmente, como ocurre en otros sistemas de detección en flujo, la emisión quimioluminiscente no es constante sino que varía con el tiempo (el flash de luz está compuesto de una señal que se produce tras la mezcla de los reactivos, alcanza un máximo y después cae hasta la línea de base), y este perfil de emisión frente al tiempo puede variar ampliamente en diferentes sistemas quimioluminiscentes, por lo que hay que extremar el cuidado para detectar la señal en sistemas en flujo, midiendo en periodos de tiempo bien definidos.

Las reacciones quimioluminiscentes pueden generarse mediante dos mecanismos básicos, por lo que la clasificación de estas reacciones se ha establecido en función de estos dos mecanismos:

- *Quimioluminiscencia directa*: Se parte de dos reactivos, A y B, normalmente un sustrato y un oxidante (H_2O_2 , KMnO_4 , $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$, $\text{Ce}(\text{IV})$, N-bromosuccinimida-NBS). A y B reaccionan dando un intermedio de reacción en un estado electrónicamente excitado. Este intermedio, al relajarse hasta el estado fundamental, emite un fotón. A veces, en estas reacciones, se requiere un catalizador que disminuya la energía de activación y aumenta el rendimiento cuántico de la reacción quimioluminiscente.
- *Quimioluminiscencia indirecta (sensibilizada o de transferencia de energía)*: El mecanismo es el mismo para la formación del intermedio electrónicamente excitado, pero este intermedio no puede emitir directamente el fotón para dar la quimioluminiscencia y requiere la presencia de un fluoróforo al cual le transfiere la energía, de forma que el fluoróforo se excita y al volver a su estado fundamental emite un fotón.

El rendimiento cuántico de una reacción quimioluminiscente dependerá por tanto de los rendimientos cuánticos de los distintos pasos implicados en los mecanismos de reacción.

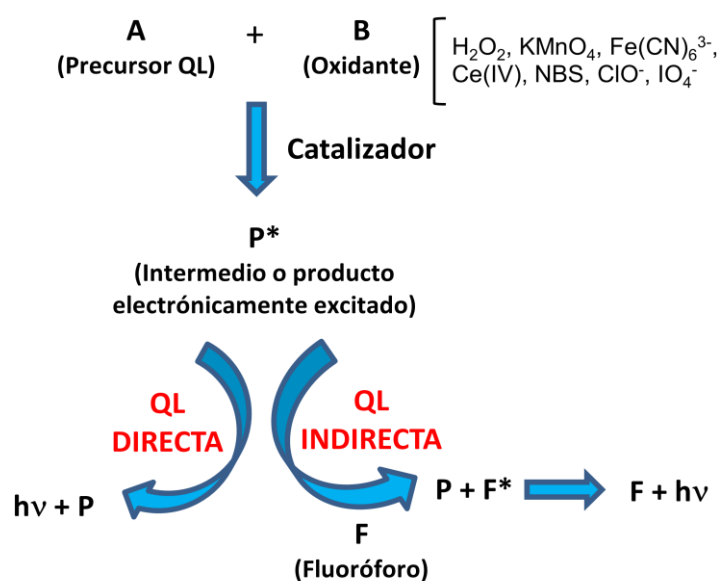


Figura 31. Mecanismos básicos de las reacciones quimioluminiscentes.

Por otra parte, considerando el esquema de la figura 31, se pueden plantear diversas estrategias analíticas en función de que el analito sea una especie química que puede participar en el proceso quimioluminiscente como: substrato o precursor quimioluminiscente responsable del estado excitado, el reactivo necesario para la reacción (generalmente un oxidante); algunas especies que afectan la velocidad o la eficacia de la reacción: activadores, como catalizadores (enzimas o iones metálicos), o inhibidores como reductores que disminuyen la emisión quimioluminiscente; fluoróforos en el caso de quimioluminiscencia sensibilizada; algunas especies que no están directamente implicadas en la reacción quimioluminiscente pero que pueden reaccionar con otros reactivos para generar un producto que es reactivo en la reacción quimioluminiscente; especies que pueden formar derivados con algún precursor quimioluminiscente, o fluoróforo determinándose mediante quimioluminiscencia directa o sensibilizada.

1.3.2. Requisitos para la emisión quimioluminiscente

Para que una reacción química emita luz, debe reunir algunos requisitos básicos:

- a) La reacción debe ser exotérmica y producir la suficiente energía para formar el estado electrónicamente excitado. En este sentido, para que ocurra una reacción quimioluminiscente, los requisitos energéticos pueden establecerse en términos de ΔG (Kcal mol⁻¹):

$$-\Delta G \geq hc/\lambda_{\text{ex}} = 2,86 \cdot 10^4/\lambda_{\text{ex}}$$

donde λ_{ex} es la longitud de onda límite (nanómetros) para la excitación de las especies luminiscentes. Como la mayoría de las reacciones quimioluminiscentes producen fotones en el rango comprendido entre 400 (violeta) - 750 (rojo) nm, la formación del estado electrónicamente excitado y la generación de QL en la región del visible requiere alrededor de 40-70 Kcal mol⁻¹. Esta condición exotérmica se asocia a las reacciones redox que emplean oxígeno, peróxido de hidrógeno u oxidantes de potenciales similares.

- b) El camino de reacción debe ser favorable a canalizar la energía hacia la formación de un estado electrónicamente excitado. En el caso de que la energía química se disipe en forma de calor, mediante vibraciones o rotaciones moleculares, la reacción no será quimioluminiscente.
- c) La emisión de un fotón debe ser un proceso de desactivación del producto excitado favorable en relación a otros procesos no radiantes que pueden aparecer en pequeña proporción, como disociación molecular, reacciones

químicas con otras especies, transferencia de energía intra- o intermolecular, isomerización o atenuación física. En el caso de quimioluminiscencia sensibilizada, tanto la eficacia y energía de transferencia de las especies excitadas al fluoróforo como la eficacia de la fluorescencia de este último deben ser considerables.

En todos los procesos luminiscentes, la intensidad de la emisión producida depende de la eficacia al generar moléculas en el estado excitado, lo cual viene representado por la eficiencia cuántica (rendimiento cuántico) y la velocidad de la reacción. En el caso de reacciones quimioluminiscentes, la intensidad puede expresarse como,

$$I_{QL} = \phi_{QL} -dA/dt$$

donde I_{QL} es la intensidad de emisión quimioluminiscente (fotones/segundo), ϕ_{QL} es el rendimiento cuántico y $(-dA/dt)$ la proporción en la que el precursor quimioluminiscente, A, es consumido. Los valores altos de rendimiento cuántico se asocian normalmente con reacciones de bioluminiscencia, mientras que en la mayoría de las reacciones quimioluminiscentes empleadas para fines analíticos, ϕ_{QL} varía entre 0.001-0.1, e incluso sistemas bastante ineficaces, con rendimientos cuánticos inferiores, pueden emplearse en análisis basados en la ausencia casi absoluta de emisión de fondo. Tal es el caso de reacciones quimioluminiscentes ultradébiles, en las que ϕ_{QL} puede ser inferior a 0.001 (a menudo 10^{-3} - 10^{-8} y algunas veces 10^{-9} - 10^{-15}). La QL

ultradébil se produce a partir de reacciones de oxidación en células vivas y las señales emitidas son a menudo 10^3 – 10^6 veces menos intensas que las de organismos luminosos, siendo invisibles a simple vista. Este tipo de QL incluye un grupo de reacciones quimioluminiscentes que, al menos en células vivas, implica cierto número de intermediarios oxigenados y que juega un papel importante en ciertos tipos de activación celular, en los sistemas de defensa del cuerpo y en enfermedades coronarias. Se han detectado en gran variedad de órganos intactos, células aisladas y tejidos homogéneos de vertebrados, invertebrados y plantas, y en varias reacciones *in vitro*.

1.3.3. Factores que influyen en la emisión quimioluminiscente

Las medidas de quimioluminiscencia están fuertemente influenciadas por aquellos factores experimentales que afectan al rendimiento cuántico y a la velocidad de reacción, como son:

- La estructura química del precursor quimioluminiscente, no solamente la parte que contiene al grupo excitado electrónicamente, sino también las cadenas laterales.
- La naturaleza y concentración de otras sustancias que afectan el proceso de QL y que favorecen otros procesos competitivos no radiantes.
- El catalizador seleccionado.
- La presencia de iones metálicos, especialmente metales de transición implicados en el proceso de oxidación.

- La temperatura.
- pH y fuerza iónica.
- La hidrofobicidad del disolvente y la composición de la disolución (por ejemplo, la ϕ_{QL} del luminol oxidado en dimetilsulfóxido (DMSO) es 0.05 comparado con 0.01 en agua, siendo los colores azulvioleta (425 nm) y verde-azulado (480-502 nm), respectivamente.
- La presencia de aceptores de la energía transferida.

1.3.4. Reacciones quimioluminiscentes

Las reacciones quimioluminiscentes en *fase líquida*, son las que presentan mayor interés analítico, dado la variedad de campos de aplicación. Las principales reacciones quimioluminiscentes utilizadas en fase líquida se describen en la tabla 8.

El *luminol* (5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazindiona), es uno de los reactivos quimioluminiscentes más comúnmente empleado en fase líquida. Fue presentado por primera vez en 1928, y la caracterización de la cinética de reacción y las especies emisoras requirió más de tres décadas de investigación. El luminol se oxida casi cuantitativamente a 3-aminofalato en medio básico tanto en disolventes polares como apolares.

Tabla 8. Reacciones y mecanismos de los principales sistemas quimioluminiscentes.

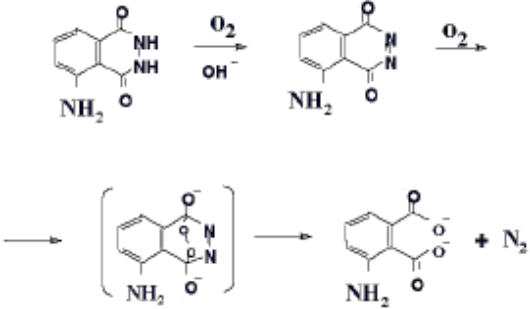

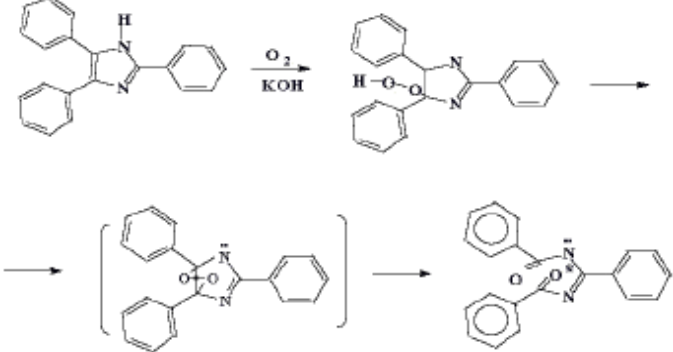

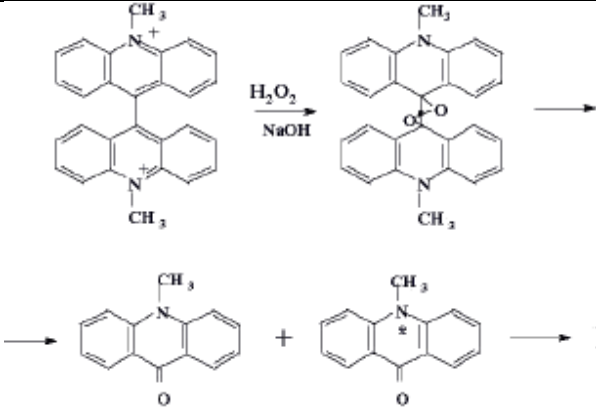

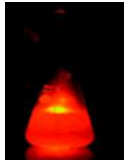
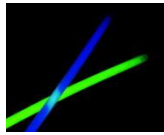


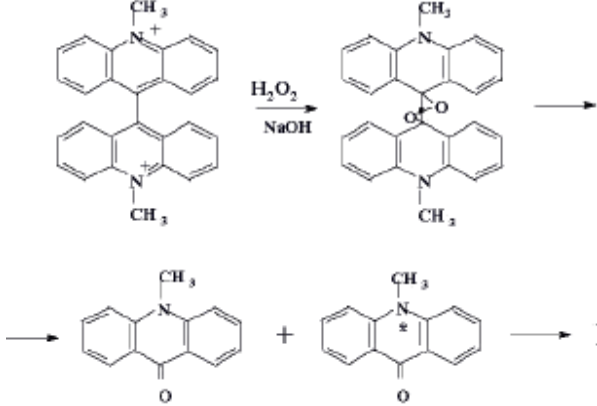
Reacción QL	Mecanismo	Emisión
Acilhidracinas (Luminol)		 $\lambda = 425 \text{ nm}$
Imidazoles (Lofina)		 $\lambda = 525 \text{ nm}$
Ésteres de acridinio (Lucigenina)		 $\lambda = 470 \text{ nm}$
Tris(2,2'- bipiridina)rutenio (III)	$\text{Ru}(\text{bipi})_3^{3+} + \text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+} \rightarrow [\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}]^*$ $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+} + \text{Oxidante} \rightarrow [\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}]^* + \text{Oxidante}^-$ $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{3+} + \text{Reductor} \rightarrow [\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}]^* + \text{Reductor}^+$	 $\lambda = 610 \text{ nm}$

Tabla 8. Reacciones y mecanismos de los principales sistemas quimioluminiscentes (continuación).

<i>Reacción QL</i>	Mecanismo	Emisión
<i>Peroxisalatos</i>	$R-O-C(=O)-C(=O)-O-R + H_2O_2 \longrightarrow R-O-C(=O)-C(=O)-O-OH \longrightarrow \left[\begin{array}{c} O-O \\ \quad \\ C-C \\ \quad \\ O \quad O \end{array} \right] \xrightarrow{F} \left[\begin{array}{c} O-O \\ \quad \\ C-C \\ \quad \\ O \quad O^- \end{array} \right] \xrightarrow{F \cdot +} F^* + 2 CO_2 \longrightarrow F + h\nu$ <p>F: fluoróforo R: <chem>Clc1ccc(Cl)cc1</chem> TCPO (pH = 5 - 9) R: <chem>O=[N+]([O-])c1ccc(cc1)[N+](=O)[O-]</chem> DNPO (pH < 3.5)</p>	 <p>λ_{em} depende del fluoróforo</p>
<i>Reacciones Bioluminiscentes</i>	<p>ATP + LH₂ → PP₁</p> <p>Luciferasa → Luciferasa (LH₂, AMP)</p> <p>AMP + OL → Luciferasa</p> <p>Luciferasa → Luciferasa (O₂, CO₂)</p> <p>Luciferasa → Luciferasa (λ = 562 nm, AMP, OL[*])</p> <p>(LH₂) Forma reducida de la D-luciferina</p> <p>(OL) Forma oxidada de la oxiluciferina</p> 	 <p>$\lambda = 562 \text{ nm}$</p>
<i>Oxidaciones Directas</i>		<p>λ_{em} depende del precursor y fluoróforo</p>

Sobre la determinación de metales a través de su efecto catalizador o inhibidor sobre la quimioluminiscencia del luminol o de la lucigenina se han publicado un considerable número de trabajos y de artículos de revisión, entre los que cabría citar los siguientes: “*Analytical applications of liquid-phase chemiluminescence*” (1992) [303]; “*Analytical applications of liquid phase chemiluminescence reactions-A review*” (1996) [304]; “*Application of the luminol chemiluminescent reaction in analytical chemistry*” (2006) [305]. Las revisiones bianuales que aparecen publicadas en la revista *Analytical Chemistry* en el apartado de *Molecular fluorescence, phosphorescence, and chemiluminescence spectrometry* constituyen una abundante fuente bibliográfica, la cual contiene un importante sub-apartado dedicado a la quimioluminiscencia de especies inorgánicas, entre ellas cationes metálicos. Una fuente inestimable de información está recogida en los 270 artículos de revisión sobre los más variados aspectos de la quimioluminiscencia, y que han sido publicados en el área de química analítica desde 1975 (fuente: *Web of Science*).

Cuando la *reacción del luminol* con peróxido de hidrógeno se da en medio acuoso, se requiere la presencia de un catalizador. Como catalizadores, se han utilizado diferentes metales de transición (Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Cr^{3+} , Ni^{2+} ...) [306], ferricianuro [307], o algunos metalocomplejos (hemina, hemoglobina) y peroxidasas [308]. La reacción se ha utilizado para la determinación de los catalizadores (límites de detección desde $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ hasta 1nmol L^{-1} según las especies), del H_2O_2 (límite de detección $0.1 \mu\text{mol L}^{-1}$) o del luminol (límite de detección 1pmol L^{-1}) [309-310]. Otros oxidantes (O_2 , I_2 , etc.), inhibidores (Ag(I) , Ce(IV) , Ti(IV) , V(V)), etc.), sustancias fácilmente oxidables e

indirectamente determinadas (ácido ascórbico, aminas, etc.), y sustancias marcadas con luminol y derivados, esta última estrategias en inmunoensayo, han sido empleado con éxito.

La *lofina* (2,4,5-trifenilimidazol) es el precursor quimioluminiscente más representativo de los imidazoles. La lofina es oxidada, en medio básico, por peróxido-hipoclorito o peróxido-hexacianoferrato (III) y O_2 a hidroperóxido, a partir del cual se forman diaroilamidinas en estado excitado a través de una estructura de dioxetano, que es la responsable de la emisión de la luz. Utilizando este sistema se han llevado a cabo determinaciones de Co(II), Cr(III), Cu(II), $Fe(CN)_6^{3-}$, MnO_4^- , ClO^- , entre otros. El empleo de cloruro de hidroxilamina aumenta la emisión quimioluminiscente del sistema lofina-Co(II)- H_2O_2 permitiendo una determinación muy sensible de Co(II) [311].

En quimioluminiscencia indirecta, el sistema más frecuentemente utilizado se basa en la reacción *quimioluminiscente de los peroxioxalatos* (PO-QL). En estas reacciones, un éster aril oxalato es oxidado por peróxido de hidrógeno en presencia de un fluoróforo. En la reacción, se forma un intermedio de elevada energía, la 1,2-dioxoetanodiona, que forma un complejo de transferencia de carga con el fluoróforo; el fluoróforo cede un electrón al intermedio y el complejo se disocia, alcanzando el fluoróforo un estado excitado. La emisión se produce al volver el fluoróforo al estado fundamental. Por tanto, las mejores condiciones de emisión quimioluminiscente se obtendrán cuanto más fácilmente oxidable sea el fluoróforo.

Puede añadirse a la reacción una base débil como trietilamina o imidazol, para catalizar la reacción y aumentar la intensidad de quimioluminiscencia obtenida. La reacción se da en un amplio rango de pH, desde 5 a 9, pero generalmente se utiliza un pH cercano a la neutralidad. El principal inconveniente de la reacción es la limitada solubilidad y estabilidad de los peroxioxalatos en medio acuoso. Generalmente se utilizan disolventes orgánicos para evitar problemas de degradación del reactivo.

De estos ésteres, los más utilizados son el TCPO (bis(2,4,6-triclorofenil)oxalato) y el DNPO (bis(2,4,6-trinitrofenil)oxalato). Este tipo de reacciones, se ha utilizado para la determinación cuantitativa de H_2O_2 obteniendo límites de detección del orden de 0.18 pmol L^{-1} [312]. La aplicación analítica más común, ha sido la detección en cromatografía líquida de fluoróforos o compuestos que no son fluorescentes pero pasan a serlo al derivatizarlos con cloruro de dansilo (como aminoácidos [313], esteroides [314], aminas alifáticas [315] y ácidos carboxílicos [316] entre otros.

Las propiedades fotoluminiscentes de los N'N' quelatos de Ru(II) fueron presentadas por primera vez en 1959, y posteriormente en 1962, se observó la *quimioluminiscencia emitida por el Tris(2,2'-bipiridina) rutenio (III)*. El estado excitado del complejo $[Ru(bipy)_3^{2+}]^*$, produce una emisión naranja a 610 nm. La emisión es fosforescencia químicamente inducida, y se puede llegar a este estado excitado de diferentes formas tal como se esquematiza en la tabla 8.

Algunos analitos que sí producen quimioluminiscencia son: aminas [317], la respuesta aumenta con el número de sustituyentes (terciarias > secundarias >

primarias), aminoácidos [318], alcaloides [319-320] (la reacción es tan selectiva que incluso para alcaloides como la codeína y la morfina con una estructura química tan similar, la codeína se puede determinar, pero la morfina no da quimioluminiscencia), e ion oxalato [321], a concentraciones incluso por debajo de 10^{-10} mol L⁻¹.

Un complejo similar Ru(Phen)₃²⁺ (Phen:1,10-fenantrolina), presenta mayor emisión al oxidarse con Ce(IV) en medio acuoso sulfúrico, permitiendo el establecimiento de un método quimioluminiscente para el análisis de ácidos nucleicos, con un gran aumento de la emisión de quimioluminiscencia [322].

Los *ésteres de acridinio* reaccionan con peróxido de hidrógeno en medio alcalino y en ausencia de catalizadores dando lugar a N-metilacridona en estado excitado que emite luz a 440 nm para esta reacción. Se ha utilizado para la determinación cuantitativa de peróxido de hidrógeno [323], pero la principal aplicación de estos ésteres radica en su uso como marcadores en inmunoensayos [324] y estudios de DNA [325-326].

La *lucigenina*, nitrato de bis-N-acridinio, no lleva el grupo éster, pero sigue el mismo mecanismo que los ésteres, con la única diferencia que requiere de la presencia de iones metálicos de transición que actúan como catalizadores. Por esta razón, se puede utilizar también la reacción para la determinación de iones metálicos si se utiliza lucigenina como reactivo quimioluminiscente.

Existen *reacciones quimioluminiscentes de oxidación directa* que hacen uso de oxidantes fuertes en diferentes condiciones químicas. Estas reacciones se han aplicado

con gran éxito en el análisis de medicamentos y pesticidas. Los oxidantes utilizados habitualmente son H_2O_2 , KMnO_4 , $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$, $\text{Ce}(\text{IV})$, N-bromosuccinimida-NBS, ClO^- y IO_4^- [327-331]. Normalmente, cuando la oxidación del analito da un producto fluorescente o el analito en sí presenta fluorescencia, cabe la posibilidad de que la oxidación del analito produzca emisión quimioluminiscencia. Para aumentar la emisión quimioluminiscencia en estos casos, se han añadido al medio de reacción sensibilizadores, medios micelares o catalizadores. Estas reacciones, se han aplicado principalmente a métodos de inyección en flujo con detección quimioluminiscente.

Dentro de las *reacciones bioluminiscentes* los sistemas más utilizados se basan en la reacción de luciferina-luciferasa [332-333]. La enzima luciferasa (muy específica) cataliza la oxidación por el aire de la luciferina en presencia de ATP, que se consume como substrato y emite luz a 562 nm. Para esta reacción es necesaria la presencia de $\text{Mg}(\text{II})$ para que la luciferasa muestre su actividad. Por cada molécula de ATP consumida, se emite un fotón, por esto, esta reacción es un sistema analítico ideal para detectar la presencia de ATP. Este sistema se emplea en el ámbito de la gestión y garantía de calidad para aumentar la higiene en alimentos, en control de calidad ambiental, en el seguimiento de plantas de aguas residuales y en la industria farmacéutica, entre otros.

1.3.5. Características de la quimioluminiscencia como técnica analítica

Como la velocidad de la reacción es función de las concentraciones de reactivos, la Quimioluminiscencia es una técnica adecuada para el análisis cuantitativo. La utilidad

de los sistemas quimioluminiscentes en química analítica se basa en algunas características especiales, que se comentan a continuación:

a) La técnica comprende simultáneamente características cinéticas y luminiscentes, por lo que proporciona una alta sensibilidad y un amplio rango dinámico. Si ϕ_{QL} es lo suficientemente alta, se pueden alcanzar límites de detección excelentes, en el rango de los femtomoles. Como ejemplo, en la fase gaseosa, los límites de detección habituales son de 10 pmol de NO empleando ozono, y 0.1 pmol para compuestos sulfurados empleando una llama de hidrógeno seguida de ozono; en la fase líquida, puede detectarse hasta 1 fmol de fluoróforo empleando el sistema quimioluminiscente con peroxioxalato, y 0.1 fmol de peroxidasa usando luminol. En comparación con otras técnicas espectrométricas, la quimioluminiscencia es aproximadamente 10^5 veces más sensible que la espectrometría de absorción y al menos 10^3 veces más sensible que la fluorimetría.

b) Comparada con los procesos de fotoluminiscencia, no se requiere fuente de excitación externa, lo que ofrece algunas ventajas, como la ausencia de dispersión y señales fotoluminiscentes de fondo, la desaparición de problemas relacionados con la inestabilidad de la fuente externa, reducción de interferencias debidas a procesos de excitación no selectivos, y una instrumentación más simple.

c) La selectividad y la linealidad son más dependientes de la reacción y de las condiciones de reacción escogidas. Como ocurre con los procesos fotoluminiscentes, la absorción o emisión de radiación por el analito, producto o cofactores, pueden causar pérdida de linealidad o interferencias espectrales.

d) La técnica es versátil para la determinación de una amplia variedad de especies que pueden participar en el proceso quimioluminiscente, como: precursor quimioluminiscente, catalizador, intermedio o producto electrónicamente excitado, fluoróforo.

e) Dependiendo de la naturaleza del analito y de la reacción quimioluminiscente, el incremento o disminución de la intensidad de quimioluminiscencia estará directamente relacionada con la concentración de analito.

f) Las reacciones quimioluminiscentes pueden acoplarse fácilmente como método de detección en cromatografía, EC o inmunoensayo, proporcionando información cualitativa o cuantitativa sobre una gran variedad de especies en las fases gaseosa y líquida.

Como regla empírica, es probable que un compuesto exhiba quimioluminiscencia cuando él o su producto derivado muestren propiedades fluorescentes. Es posible que la oxidación de tal especie produzca quimioluminiscencia, aunque hay muchas excepciones a esta regla general

1.3.6. Aspectos operativos instrumentales

1.3.6.1. Instrumentación básica

La medida de la luz emitida por una reacción química o bioquímica está relacionada con la concentración de las especies participantes: la producción total de luz está directamente relacionada con la cantidad de luz emitida y, consecuentemente, es proporcional a la concentración de la especie concreta. Por esta razón, la medida de luz emitida es un indicador de la cantidad de analito presente y al instrumento básico que es capaz de realizar estas medidas se le llama luminómetro. Una de las ventajas más importantes de la quimioluminiscencia como técnica analítica es la simplicidad de la instrumentación, que incluye como componentes principales: una celda de reacción, un compartimento cerrado a la luz, un dispositivo de inyección y mezcla de reactivos y/o de muestra, un detector de luz y un sistema de adquisición y procesador de señal (figura 32).

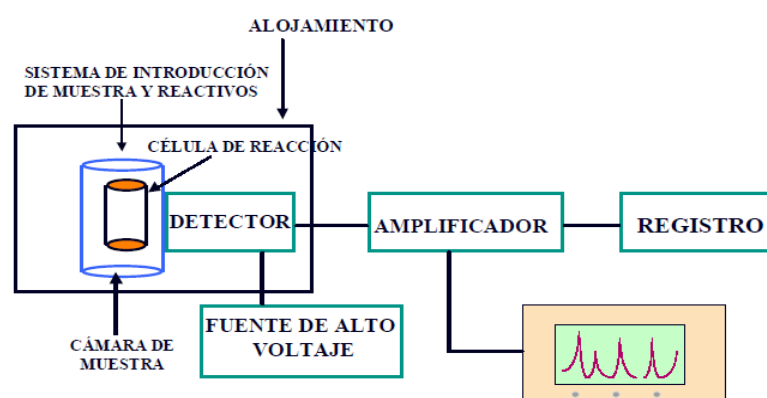


Figura 32. Esquema de configuración básica de un luminómetro.

En el compartimento cerrado se coloca la celda de reacción (un tubo de ensayo, un microplato, una célula de flujo, etc.) con objeto de que toda la luminiscencia sea captada por el detector. Este compartimento debe estar sellado a luz ambiental para evitar posibles interferencias y se debe colocar tan cerca como sea posible del detector para conseguir una máxima eficiencia óptica. Espejos, lentes y otros dispositivos adicionales se pueden utilizar para aumentar el ángulo de detección y conseguir una alta eficiencia óptica, al objeto de obtener una relación señal-ruido óptima; así, se obtiene un instrumento rápido y preciso. La función del compartimento es mantener la mezcla de reactivo y muestra, a una temperatura adecuada y en completa oscuridad a fin de aislar el detector de la luz externa. Normalmente no es necesario el uso de monocromadores porque la intensidad de quimioluminiscencia que surge de una de las especies no se ve apenas afectada en su distribución espectral, por la presencia de otras especies.

En las técnicas de quimioluminiscencia, una vez mezclados los reactivos y la muestra comienza la reacción quimioluminiscente y la intensidad de la emisión que se está produciendo, disminuye una vez que los reactantes se han agotado. Esto supone que el carácter de la emisión quimioluminiscente es transitorio, y que la escala de tiempo depende de la reacción en cuestión, que va de un corto flash a una emisión continua. Este hecho es crucial para la selección del sistema más conveniente para la incorporación de los reactivos.

Existen dos modalidades básicas para realizar medidas de quimioluminiscencia:

- Medidas en estático.
- Medidas en flujo, bien sea continuo o segmentado.

1.3.6.2. Procedimiento en estático

En esta modalidad se mezcla una proporción de reactivo quimioluminiscente y analito. La muestra se coloca en una cubeta que está dentro de una cámara del luminómetro, situada frente a la ventana del tubo fotomultiplicador y con ayuda de una jeringa se añaden proporciones del reactivo quimioluminiscente o bioluminiscente.

1.3.6.3. Procedimiento en flujo continuo

En los métodos en flujo continuo, el reactivo quimioluminiscente y el analito fluyen en continuo por canales separados. Ambos flujos se mezclan en un solo canal (figura 33). La observación se realiza en una posición fijada después de la confluencia. El volumen entre el punto de mezcla y el punto de observación, y el canal de flujo, determinan el tiempo de reacción transcurrido y, por lo tanto, el perfil de la intensidad de la emisión quimioluminiscente frente al tiempo de reacción.

Los elementos esenciales para la determinación quimioluminiscente en flujo continuo son: un sistema de impulsión de muestra y reactivos, una cámara o dispositivo de mezclado de reactivos, celda de flujo, fotodetector (normalmente un tubo fotomultiplicador) un dispositivo electrónico para adquirir y procesar los datos. Muchos instrumentos diseñados para otros propósitos incluyen todos estos elementos y, por tanto, se pueden utilizar para medidas químio y bioluminiscentes. Es, pues,

128

común encontrar en el trabajo en FIA el uso de sistemas no específicos, modificados a tal efecto, tales como espectrofluorímetros en los que se sustituye el monocromador de emisión por sistemas adecuados para la reflexión total de radiación emitida.

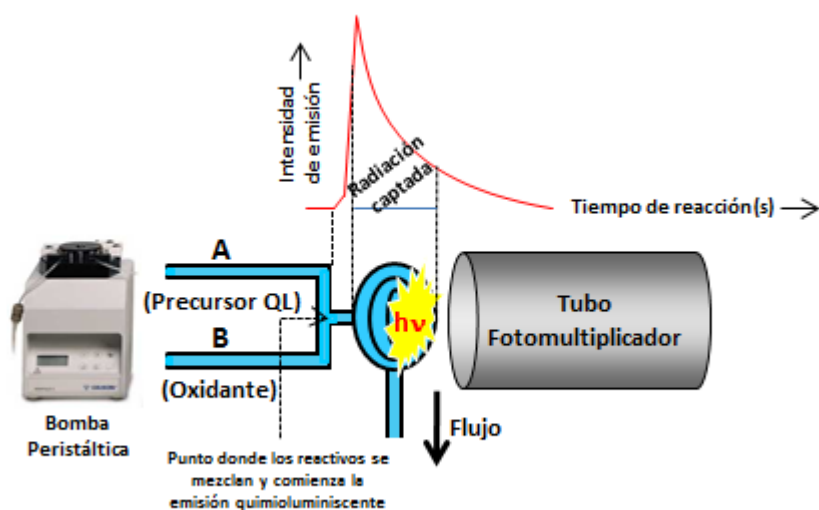


Figura 33. Intensidad de emisión quimioluminiscente frente al tiempo en un sistema de flujo.

En la figura 33, se muestra un sistema básico FIA para determinaciones quimioluminiscentes. La muestra se inserta en un portador apropiado. El reactivo que circula por un canal diferente confluye con el flujo de muestra/portador tan cerca como sea posible de la celda de flujo; una vez en la celda, la emisión resultante de la mezcla de reacción se monitoriza mediante un tubo fotomultiplicador conectado al dispositivo electrónico correspondiente.

Experimentalmente, la disposición de los elementos para las determinaciones quimioluminiscentes se optimiza normalmente atendiendo al tipo de conector empleado en la confluencia de flujos y, al tamaño y configuración de la celda. Basándose en resultados puramente empíricos, muchos autores indican que las piezas

en forma de T son los conectores más eficientes para mezclar dos flujos, mientras que otros autores opinan que las piezas en forma de Y proporcionan igual eficiencia.

En lo que a la quimioluminiscencia se refiere, entre las monografías clásicas cabría citar "*Bioluminescence and chemiluminescence. Instruments and applications*", CRC Press, Boca Ratón, 1985. Otras monografías de referencia más recientes, se centran en las aplicaciones de la quimioluminiscencia en la Química Analítica con especial atención a los sistemas en flujo continuo: "*Chemiluminescence in Analytical Chemistry*" (Ana M^a García Campaña, Willy R.G. Baeyens) editado por Marcel Dekker (2001).

Reacción muestra-reactivo

La reacción quimioluminiscente en un sistema FIA tiene lugar al confluir dos flujos que contienen la muestra y el reactivo, respectivamente. El mezclado debe tener lugar cerca de la celda por razones cinéticas. Las medidas de la quimioluminiscencia puede hacerse unas décimas de segundo después del mezclado; esto es particularmente útil para monitorizar cinéticas (reacción y emisión) rápidas.

Los sistemas heterogéneos en los que alguno de los reactivos que intervienen en el proceso quimioluminiscente se inmoviliza (física o químicamente) sobre un soporte sólido tienen también un gran interés analítico. La emisión quimioluminiscente depende tanto de la cinética de la reacción como de la eficacia de los procesos de transferencia de masas que entran en juego cuando los reactivos se ponen en contacto. Este tipo de sistemas ha sido ampliamente usado para inmovilizar enzimas en soportes sólidos y presentan ventajas en cuanto al menor consumo de reactivos, al

aumento de la estabilidad del enzima y a la compatibilidad con sistemas en flujo continuo automatizados.

La modalidad de flujo detenido constituye una técnica valiosa en asociación con el FIA y otras técnicas en flujo. Después de mezclarse la muestra y el reactivo eficientemente, la mezcla de reacción se detiene en la celda de flujo con el fin de realizar medidas basadas en curvas de intensidad de emisión frente al tiempo. La información cinética se obtiene de la señal completa (de la velocidad de ascenso y descenso) y se puede relacionar con la concentración de analito con una precisión y selectividad mayores que la altura o el área de la curva de intensidad de emisión frente al tiempo.

La combinación de la detección quimioluminiscente con cromatografía líquida es potencialmente la mejor opción ya que de esta forma se consigue por un lado la sensibilidad de la detección quimioluminiscente y por otro la selectividad propia de las técnicas cromatográficas. En este sentido, el uso de la cromatografía líquida capilar empleando sílice fundida presenta buenas expectativas [334].

Celdas de flujo

El tipo de celda de reacción va a depender de que la reacción de quimioluminiscencia se lleve a cabo en fase líquida, sólida o gaseosa, siendo un requerimiento esencial para su diseño que el máximo de intensidad se produzca cuando la mezcla analito y el reactivo quimioluminiscente transportada coincida con el detector (figura 33). Es una variable muy crítica porque tanto en los métodos estáticos

como en los de flujo, la magnitud de la intensidad de quimioluminiscencia es proporcional al volumen de la celda. Normalmente, es posible usar cualquier material que sea transparente a la luz en la región del visible y que sea compatible con la muestra, tales como vidrio, cuarzo, plástico acrílico u otros. El poliestireno no es aconsejable, porque adquiere con mucha facilidad electricidad estática y puede producir una señal alta de fondo. Las celdas construidas con los materiales más transparentes permiten la llegada de una mayor cantidad de luz al detector, consiguiéndose con ello unos mejores límites de detección.

En el caso de los métodos de inyección en flujo, el diseño más frecuente de la celda es en espiral (de aproximadamente 1 cm), colocándose lo más cerca posible del detector. Para minimizar el ensanchamiento de banda y reducir los efectos de filtro interno en la emisión de quimioluminiscencia se necesita que la celda tenga un grosor pequeño (50-100 μm) y una superficie relativamente grande ya que la cantidad de luz emitida es directamente proporcional al volumen de la misma. Con objeto de reducir la dispersión de la muestra, generalmente la válvula de inyección y la celda se deben colocar tan cerca una de otra como sea posible.

Detector

Hay cuatro requerimientos básicos para el detector, que constituye la parte crítica del luminómetro [302]:

- a) Debe ser capaz de detectar una señal luminosa de varios órdenes de magnitud de intensidad (desde unos pocos fotones por segundo a decenas de millones por segundo).
- b) Debe ser sensible al menos en la región espectral de 400-600 nm, idealmente en la región completa del visible (380-750 nm) incluso en la regiones pertenecientes al UV e IR.
- c) La señal registrada por el detector debe estar relacionada directamente con la intensidad de luz que ha llegado a él, idealmente directamente proporcional en todo el rango de sensibilidad requerido. La señal producida por el detector debe poder ser fácilmente leída, registrada y analizada.
- d) La velocidad de respuesta del detector debe ser más rápida que la velocidad de la reacción de QL; en caso contrario, la señal será una versión distorsionada de la señal original.

La luz es detectada por dispositivos fotosensibles que generan una fotocorriente. Los fotomultiplicadores, son los detectores más comúnmente utilizados en quimioluminiscencia debido a su alta ganancia, que posibilita la detección de bajos niveles de luz [335-336]. Sin embargo, deben estar conectados a un estabilizador de corriente para poder mantener constante la ganancia total.

Los tubos fotomultiplicadores (figura 34) constan de un cátodo que emite electrones al recibir radiación electromagnética, un ánodo colector de electrones y una serie de electrodos intermedios denominados dínodos, conectados de tal forma que el

primer dínodo esté a un potencial superior al cátodo, cada dínodo está a un potencial superior al anterior e inferior al siguiente y el ánodo a un potencial superior al último dínodo, siendo constantes la diferencia de potencial entre dos dínodos sucesivos (así como entre el cátodo y el primer dínodo, y entre el último dínodo y el ánodo), generalmente de 90 V. La d.d.p. total suele oscilar entre 800 y 1300 V.

Al recibir el cátodo la radiación electromagnética, éste emite electrones que son acelerados y captados por el primer dínodo. El impacto de cada electrón en este primer dínodo arranca de su superficie numerosos electrones que son acelerados y captados por el segundo dínodo y así sucesivamente. Por cada fotón captado por el cátodo llega al ánodo un torrente de electrones, que en el caso de que existan nueve dínodos será del orden de 10^6 - 10^7 electrones por cada electrón emitido por el cátodo. La corriente producida guarda proporcionalidad con la intensidad de la luz emitida y puede amplificarse mediante circuitos electrónicos (figura 34).

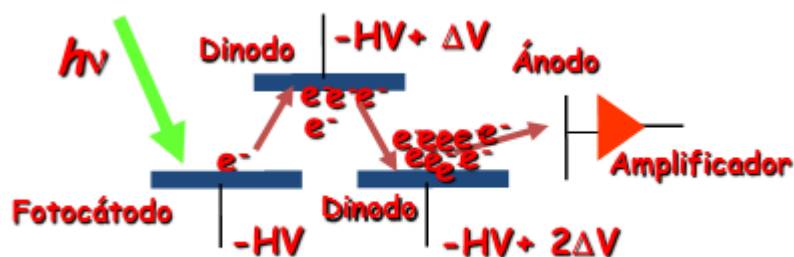


Figura 34. Esquema del funcionamiento de un tubo fotomultiplicador.

Hay dos configuraciones posibles para los fotomultiplicadores dependiendo de su posición con respecto a la célula de reacción: en disposición lateral (configuración “side-on”) o frontalmente a la celda de reacción (configuración “end-on”). Los

fotomultiplicadores “side-on” suelen ser más baratos que los “end-on” y su configuración vertical hace que ocupen menos espacio que los últimos. Sin embargo, los “end-on” tienen un fotocátodo con mayor área y ofrecen una uniformidad superior en la detección y en la respuesta de la señal luminosa (figura 35) [336].

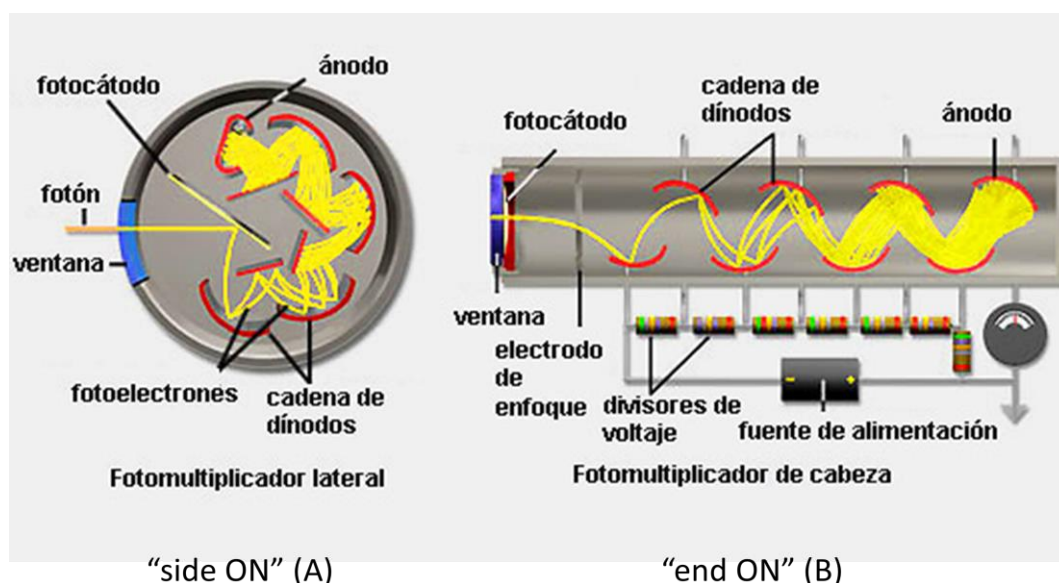


Figura 35. Sección de tubos fotomultiplicadores: configuración “side ON” (A), “end ON” (B) (<http://mednuclear.wkidot.com/tubos-fotomultiplicadores>)

Otros modos de detección en reacciones que presentan quimioluminiscencia o bioluminiscencia intensa son los detectores multicanales, que proporciona la detección simultánea de la radiación dispersada y produce una imagen permanente de un área amplia. Se usan películas o placas fotográficas que constan de emulsiones que contienen cristales de haluro de plata, de modo que cuando inciden fotones sobre ellas se produce una cascada estable de átomos de plata en el interior del cristal. La amplificación interna en el desarrollo del proceso se consigue a través de un donante de electrones, que reduce los iones de plata restantes a átomos de plata dentro de los cristales que han estado expuestos a la emisión. Suele utilizarse un agente

complejante para eliminar los iones plata que no han reaccionado. La detección fotográfica es un proceso integrante en el que la señal de salida (densidad de plata en la película) es el resultado del efecto acumulativo de la radiación incidente total durante el tiempo de exposición. La imagen está constituida por muchos miles de granos de plata por cada cm^2 de película, siendo necesario solamente de 10 a 100 fotones para producir el desarrollo de los granos de plata. Las principales limitaciones son: la no linealidad de las respuestas en un amplio rango de intensidades de luz necesarias para observar la emisión de quimioluminiscencia y los efectos adyacentes. Otros dispositivos más eficientes para la obtención de imágenes en quimioluminiscencia son los dispositivos de carga acoplada (CCDs, *Charged Coupled Devices*), que recientemente han sido incorporados a la instrumentación en quimioluminiscencia.

Los CCDs deben su invención a W.S. Boyle y G. E. Smith de los laboratorios Bell en 1969. Actualmente es el sistema de detección más generalizado en observación astronómica.

Los CCD combinan las ventajas de la detección fotográfica y los fotómetros fotoeléctricos. Las principales ventajas son:

- a) *Elevada eficiencia cuántica y elevada sensibilidad*: Es la fracción de fotones incidentes en el chip que son detectados. En la mayoría de los casos alcanza el 80%. Resultan menos sensibles que los tubos fotomultiplicadores (son sin

embargo más sensibles que estos para la luz roja y más que el resto de los sistemas de detección de fotones).

b) *Amplio intervalo espectral y respuesta uniforme*: Presentan un amplio intervalo espectral de respuesta, principalmente en el visible, donde la respuesta es bastante uniforme. Sin embargo, proporcionan una respuesta pobre al azul y la radiación ultravioleta.

c) *Bajo ruido de fondo*: Son mucho menos sensibles a los fotones térmicos, por lo cual para alcanzar bajos límites de detección no se hace tan imprescindible el uso de dispositivos de refrigeración.

d) *Respuesta digitalizada e imaging devices*: La respuesta obtenida proporcionando una imagen digitalizada del espectro absorbido/emitado por la muestra problema.

e) *Detector multicanal*: Permite la medida simultánea pero discriminada de todas las longitudes de onda.

El dispositivo requiere la realización de cuatro tareas para generar una imagen:

1. *Generar una carga*: La primera etapa consiste en el efecto fotoeléctrico. Los fotones incidentes excitan a los electrones de valencia del material semiconductor a la banda de conducción, creando pares de electrones y huecos. Estos pares se difunden a través de la estructura reticular de silicio.

2. *Almacenar una carga*: Cuando se aplica un potencial de inversión al diodo (pixel del dispositivo CCD) se crea un foso de potencial en la región de agotamiento. Cuanto mayor es este foso de potencial más electrones son almacenados. El conjunto de electrones almacenados recibe el nombre paquete de carga.

3. *Transferir una carga*: Aplicando un potencial positivo al electrodo adyacente y disminuyendo el potencial del electrodo original, el paquete de carga se transvasa a este segundo electrodo. Repitiendo esta operación para el resto de electrodos se produce una descarga en cascada que deja listo el detector para recibir una nueva señal.

4. *Lectura y digitalización de la carga*: Finalmente la descarga es registrada y decodificada en formato digital.

1.3.7. Luminiscencia fotoinducida

La irradiación de una molécula puede romperla en fragmentos más pequeños o moléculas de menor peso molecular (fotólisis) o inducir fotociclación, fotoisomerización, fotooxidación o fotorreducción. La fotodegradación puede ocurrir de manera directa o indirecta. La fotólisis directa implica la absorción de fotones por la molécula que va a ser transformada. La fotólisis indirecta implica la absorción de energía de otra molécula que ha absorbido previamente fotones. La reacción de fotólisis depende de la cantidad de energía necesitada para romper enlaces, de la energía suministrada y la presencia de intermediarios apropiados. Las variables que

influyen en el proceso de degradación fotolítica dependen de la intensidad de la luz, el tiempo de exposición, localización y propiedades químicas de las moléculas.

La fotorreacción implica los siguientes pasos:

- Absorción de luz o generación de un estado electrónicamente excitado de la molécula.
- Procesos fotoquímicos que implican la excitación de la molécula.
- Procesos de reacción de los intermedios producidos en el paso previo.

Las moléculas en las que al ser fotodegradadas, tras la irradiación con luz ultravioleta, se transformen en fotoproductos luminiscentes o más luminiscentes que la molécula de partida, se pueden detectar con técnicas más selectivas y sensitivas como son la quimioluminiscencia fotoinducida y la fluorescencia fotoinducida.

Estas técnicas utilizan la luz como reactivo y sus ventajas son:

- Tienen un mínimo impacto medioambiental al minimizar o evitar el uso de reactivos potencialmente tóxicos, y por lo tanto, la eliminación de residuos tóxicos se minimiza.
- Evita la necesidad de diluir las muestras.
- El uso de lámparas con diferentes características espectrales puede incrementar la sensibilidad. De hecho, la luz puede inducir una variedad de reacciones incluyendo oxidación, reducción, e hidrólisis.

- Muy a menudo, disminuyen los tiempos de análisis de las reacciones fotoquímicas.
- Los tiempos de reacción son acortados alterando las condiciones de irradiación, por ejemplo, potencia de la lámpara, configuración del reactor, etc.
- Existe una gran variedad de lámparas comerciales disponibles.
- La alta estabilidad de la fuente de luz conlleva alta reproducibilidad.
- Se pueden acoplar a equipos de flujo continuo facilitando la automatización de los procesos y simplificando el proceso analítico, prescindiendo de la necesidad de reactivos de propulsión y sistemas de mezclado.

Una reacción fotoquímica puede ser analíticamente útil si se cumplen los siguientes requerimientos:

- La luz utilizada que induce la formación de fotoproductos, es fuertemente absorbida por el analito, pero no por los productos.
- El rendimiento fotoquímico es alto.
- Los fotoproductos obtenidos son estables durante el tiempo necesario para completar el análisis. Esto es raramente un problema con las técnicas de flujo continuo, porque los montajes son cerrados, y la fotorreacción puede tener lugar en la celda de flujo del fluorímetro o luminómetro donde se produce la

reacción quimioluminiscente; solo unos segundos de estabilidad es tiempo suficiente.

- El fotorreactor está debidamente diseñado en lo que respecta al material de construcción y configuración espacial.

1.3.7.1. Ventajas de la quimioluminiscencia fotoinducida

Con la quimioluminiscencia fotoinducida se observa una relación lineal entre la intensidad de la quimioluminiscencia y la concentración de analito inicial.

Las ventajas de usar como reactivo la luz en quimioluminiscencia fotoinducida se muestran a continuación:

- Se amplía la variedad de muestras que pueden ser detectadas por estas técnicas.
- Proporcionan mejor sensibilidad.
- Mejoran la simplicidad y tiempos del análisis.
- Simplifican el proceso analítico y permiten un tratamiento efectivo on-line de la muestra.
- La señal luminiscente es proporcional a la concentración de analito.
- En muchos casos se puede prescindir de separar los productos.
- Pueden ser implementados en sistemas de flujo continuo.

En quimioluminiscencia la muestra es irradiada on-line y mezclada con los reactivos apropiados hasta llegar a la celda, donde es colocada delante del detector.

Los métodos en flujo son especialmente atractivos para este tipo de determinaciones ya que permiten que el tiempo de irradiación sea fácilmente controlable y los fotoproductos pueden ser detectados. Estos fotoproductos a menudo son inestables, y el uso de métodos en flujo proporcionan y mejoran la reproducibilidad, a la vez que minimizan el consumo de reactivos.

1.3.7.2. Aspectos operativos e instrumentales

Los fotorreactores contienen dos elementos esenciales: la fuente de luz y el reactor propiamente dicho.

La fuente de irradiación (lámpara) se elige por la potencia y espectro. Pueden emitir en espectro continuo o discontinuo. Abarcan una amplia zona del espectro ultravioleta-visible.

Lámparas

Las lámparas de Xe-Hg se comercializan con elevada potencia pero emiten gran cantidad de calor, y requieren el uso de dispositivos refrigerantes. Esta lámpara es ampliamente utilizada cuando se requiere gran cantidad de energía.

La luz ultravioleta es la porción del espectro electromagnético que se encuentra entre los rayos X y la luz visible (figura 36). Se han definido cuatro regiones del espectro UV- vacío UV entre 100 y 200 nm, UVC entre 200 y 280 nm, UVB entre 280 y 320 nm, y UVA entre 320 y 400 nm (Meulemans, 1986).

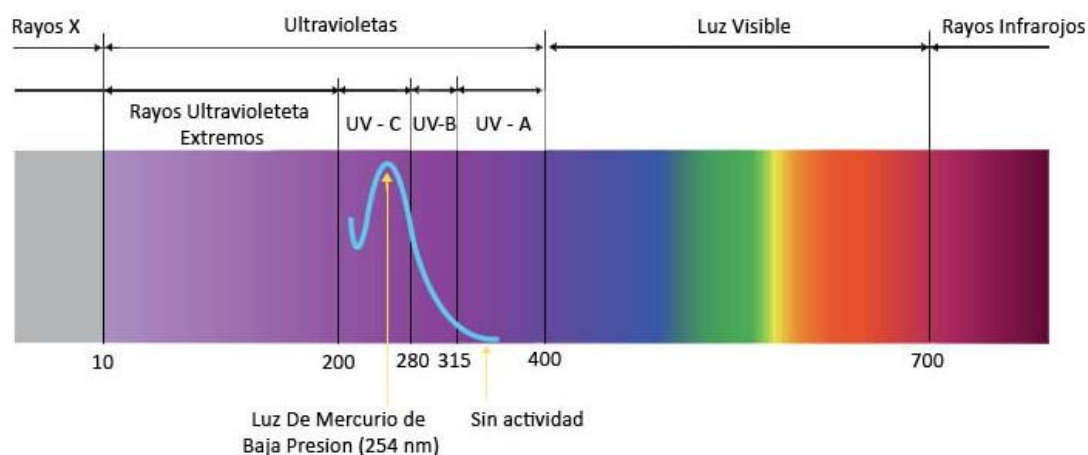


Figura 36. Espectro de la lámpara de mercurio de baja presión.
(www.clearwater-tec.com)

Las lámparas que proporcionan líneas individuales del espectro abarcan una estrecha longitud de onda. Un ejemplo es la lámpara de Hg de baja presión (figura 36), que emite en el rango (200-320 nm) y un máximo en 254 nm. También muestra líneas menores entre 300 y 600 nm. La segunda línea más fuerte se presenta a 184.9 nm. La lámpara es utilizada en casos en el que el componente absorbe en esta zona del espectro. Las más utilizadas son las de amplio espectro que abarcan la zona más utilizada de excitación.

Las lámparas de baja presión están diseñadas para operar a su óptima eficiencia con una temperatura de 40°C en la pared de lámpara y una potencia de arco eléctrico cercana a 0.3 W. Las lámparas UV de baja presión, producen un 35% de su energía directamente en el UV a 254 nm (eficiencia global), la cual tiene una alta efectividad germicida (del orden del 90% aproximadamente) [337].

Reactores

El reactor permite confinar la disolución que contiene el analito para su fotodegradación on-line. En este sentido son importantes tanto la configuración como el material con el que han sido fabricados. La configuración mas eficiente de acuerdo con el número de trabajos publicados es aquella en la cual el reactor es enrollado helicoidalmente alrededor de la lámpara o fuente de irradiación. De esta forma, puede ser expuesta una gran superficie del reactor a la radiación, aumentando considerablemente el rendimiento del proceso de fotodegradación. En cuanto al material, es necesario que éste sea transparente a la radiación ultravioleta, zona espectral principal en el tipo de fuentes empleadas (lámpara de mercurio de baja presión). En este sentido, el cuarzo y el Teflon, éste último ampliamente utilizado en la configuración de sistemas de flujo en FIA, resultan ser materiales muy adecuados. El Teflón no presenta los problemas de rigidez asociados al cuarzo y por lo tanto es posible de una manera simple el diseño de diferentes configuraciones adaptadas a las dimensiones de la fuente disponible. Otra de las ventajas del Teflón, estriba en la estructura de los microporos que presentan los tubos fabricados con este material; las radiación ultravioleta penetra a través de los microporos y sufren múltiples reflexiones en las paredes internas del tubo, incrementando de forma significativa la eficacia de la fotoirradiación. Por último, el precio de un reactor de Teflón es sensiblemente inferior al de un reactor de cuarzo de las mismas dimensiones y configuración.

1.3.8. Aplicaciones de la quimioluminiscencia fotoinducida en flujo continuo a la determinación de pesticidas

Las aplicaciones analíticas de la quimioluminiscencia fotoinducida se resumen en la tabla 9.

Los tipos de muestras empleados en la determinación de pesticidas son: 11 artículos cuya muestra es agua, 2 en suelos, 3 en formulaciones técnicas, y 3 en plantas. Es de destacar que prácticamente la totalidad de los artículos publicados hasta el momento de quimioluminiscencia, los tiempos de fotoirradiación son inferiores a 150 s, lo que pone de manifiesto la eficacia de los procesos de fotoirradiación on-line.

Tabla 9. Aplicaciones de la quimioluminiscencia fotoinducida en flujo continuo a la determinación de pesticidas

Analito	Metodología de flujo	Medios y reactivos para la fotoirradiación	Sistema oxidante	Tiempo de fotoirradiación	Límite de detección ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Velocidad de muestro (h^{-1}) (dsr)	Tipo de muestra	Año	Referencia
Carbofuran Promecarb	FIA	Disolución amortiguadora de fosfato pH= 6,5	Tris (2,2'-bipiridina) rutenio (II)/ peroxidisulfato	85 s	53 85	200 (1,6%)	Agua, suelo, maiz	2002	[338]
Ferbam	FIA	Fe(III)	Oxalato	90 s	200	45 (1,23%)	Agua, maiz	2003	[339]
Carbaril	FIA	Disolución amortiguadora de fosfato pH= 6,5	Tris (2,2'-bipiridina) rutenio (II)/ peroxidisulfato	85 s	12	200 (1,2%)	Agua, suelo, maiz, suero	2003	[340]
Carbaril	FIA	Imidazol/SDS	Bis(2,4,6-triclorofeniloxalato)/ o-ftaldehido/ H_2O_2	25 s	31	114 (2,8%)	Agua, plantas	2004	[341]
Asulam	MC	Disolución amortiguadora Glicina pH = 8,3	$\text{KMnO}_4/\text{H}_2\text{SO}_4$	90 s	40	30 (4,1%)	Agua	2004	[198]
Aldicarb	MC	Fe (III)/quinina	$\text{KMnO}_4/\text{H}_2\text{SO}_4$	150 s	0,069	17 (3,7%)	Agua, formulaciones técnicas	2004	[199]

Tabla 9. Aplicaciones de la quimioluminiscencia fotoinducida en flujo continuo a la determinación de pesticidas (continuación).

Analito	Metodología de flujo	Medios y reactivos para la fotoirradiación	Sistema oxidante	Tiempo de fotoirradiación	Límite de detección ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Velocidad de muestro (h^{-1}) (dsr)	Tipo de muestra	Año	Referencia
Clorsulfurón	MC	Disolución amortiguadora Glicina pH = 9,5	$\text{KMnO}_4/\text{H}_2\text{SO}_4$	100 s	60	25 (3,8%)	Agua	2005	[342]
Propanil Alacloro Flumetsulam Furalaxil Ofurace	MC	Disolución amortiguadora Acético/acetato pH = 5	$\text{KMnO}_4/\text{H}_2\text{SO}_4$	120 s	8,5 41 25 34 58	20 (2,9%) (2,8%) (1,9%) (3,4%) (2,3%)	Agua, formulaciones técnicas	2006	[202]
Bromoxinil	FIA	KOH/etanol	$\text{KMnO}_4/\text{ácido polifosfórico}$	12 s	5	134 (2,3%)	Agua, formulaciones técnicas	2006	[343]
Ziram/Zineb	FIA	H_2SO_4	$\text{H}_2\text{SO}_4/\text{quinina}/\text{Ce(IV)}$	105 s	1 ng mL^{-1}	121/101 (1,9/1,2)	Agua	2008	[344]
Dimetoato	FIA	NaOH	$\text{Ce(IV)}/\text{quinina}/\text{H}_2\text{SO}_4$	67 s	$0,05 \text{ ng mL}^{-1}$	105 (1,2%)	Agua	2012	[6]

1.4. Topología molecular y Química Analítica

1.4.1. Conceptos fundamentales

El postulado principal de cualquier método de diseño molecular es que las propiedades macroscópicas o microscópicas de un compuesto químico dependen de su estructura [345], es decir:

$$\text{PROPIEDAD} = f(\text{ESTRUCTURA})$$

La topología es una disciplina matemática que estudia las posiciones y conexiones entre los diferentes elementos de un conjunto. Cuando se aplica a estructuras químicas estudia las conexiones entre átomos en una molécula, se conoce como topología molecular. La cuestión fundamental es qué átomo está ligado a cualquier otro y cuál es el camino para ir de un átomo a otro dentro de la molécula.

Actualmente se pueden distinguir tres corrientes en la búsqueda y diseño asistido por ordenador de nuevas moléculas.

- Los métodos QSAR (siglas en inglés de *Quantitative Structure-Activity Relationship*), es decir, relación cuantitativa estructura-actividad. Entre ellos destacan los modelos de Hansch, Free-Wilson, etc. Emplean descriptores fisicoquímicos para establecer relaciones con las propiedades de la molécula, a través de ecuaciones de correlación que permiten predecir cuál va a ser el comportamiento de un nuevo producto activo.

- Métodos mecanocuánticos. Su principal objetivo es el cálculo, a través de la Mecánica Cuántica, de parámetros físicos y geométricos de las moléculas, tales como energías, cargas, distancias interatómicas, etc., que nos permitan prever el comportamiento de la molécula con óptima actividad.
- Métodos de modelización molecular. Se diferencian de los anteriores en que hacen un tratamiento mecanoclásico de la molécula, estudiando energías vibratorias, rotatorias, ángulos de enlace, etc., de modo que podamos obtener los conformeros más activos. Frecuentemente se combinan con los mecanocuánticos.

Se puede caracterizar una molécula de una manera única a través de índices preestablecidos que proporcionan información completa acerca de la estructura (molécula) en estudio, como número de átomos, número de insaturaciones, tipo de unión, y si hay diferentes tipos de átomos [346].

Para definir dichos índices, el primer paso es representar a los átomos por puntos llamados *vértices* y a los enlaces por segmentos a los que se denomina *ejes o aristas*, eliminándose los átomos de hidrógeno. De esta manera se obtiene el *grafo* de la molécula. Dichos grafos fueron ya estudiados en 1871 por el ruso Flavitzy y en 1875 por el inglés Cayley, constituyendo hoy en día la base de una disciplina matemática llamada “teoría de grafos”.

Una vez dibujado el grafo, se numeran aleatoriamente los distintos vértices o átomos del grafo y se construye la llamada *matriz topológica*, cuyos elementos t_{ij} valen

un número entero o cero dependiendo de que el átomo “i” esté enlazado al “j” o no. Es importante destacar que la numeración del grafo es totalmente aleatoria, por lo que los índices topológicos no dependerán del orden de numeración, por esta razón los matemáticos los conocen como invariantes de grafo.

Tras una manipulación adecuada de la matriz topológica y utilizando diversos algoritmos, se obtiene un índice o un conjunto de ellos que caracterizan de manera única la estructura molecular. Estos índices son, por tanto, descriptores numéricos de la estructura molecular.

Una vez obtenido un índice (o varios), si se establecen correlaciones entre ellos y diferentes propiedades físicas, químicas o biológicas para grupos de compuestos más o menos homogéneos, se pueden enunciar ecuaciones que relacionan tales propiedades o actividades con la estructura molecular, caracterizada a través de sus índices. Estas ecuaciones se conocen como “funciones de predicción” también llamadas de conectividad. Por otro lado, si las funciones están destinadas a clasificar los compuestos en función de su actividad se obtienen las “funciones de discriminación” (figura 37).

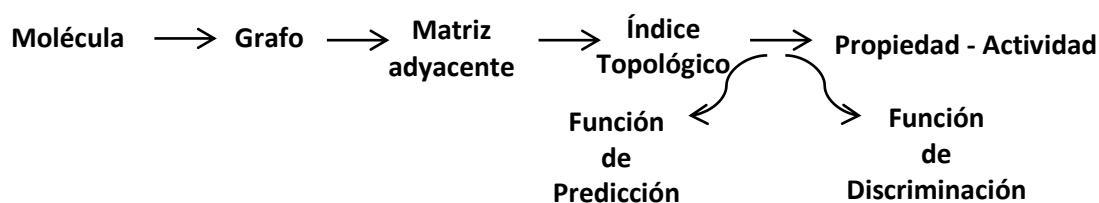


Figura 37. Diagrama de Flujo en Conectividad Molecular.

Si se calculan entonces los valores de los índices de moléculas que no hayan sido utilizadas en la obtención de la función y se sustituyen en la ecuación, se puede predecir el valor de la propiedad o la actividad correlacionada para ese compuesto, que puede incluso no tener aún una existencia física. Se trata por tanto, de usar las características topológicas de las moléculas conocidas para predecir las propiedades o la actividad de moléculas desconocidas.

1.4.2. La matriz topológica

El primer paso para aplicar el método de predicción de una propiedad-actividad por conectividad molecular, consiste en expresar de forma numérica las estructuras moleculares mediante la matriz topológica. En 1874, el matemático Sylvester demostró que una molécula podía ser representada por una matriz de dos dimensiones a la que llamó Matriz Topológica de Adyacencia. La obtención de dicha matriz a partir de la estructura de la molécula a estudiar comprende los siguientes pasos:

- Dibujar el grafo de la molécula suprimiendo los átomos de hidrógeno.
- Numerar los átomos (vértices) del grafo, sin importar el orden en que se realice.
- Construir la matriz topológica, de forma que cada término t_{ij} tendrá el valor 1, 2, 3, o 4 cuando haya uno, dos, tres o cuatro enlaces entre el vértice "i" y el vértice "j" respectivamente, y tendrá el valor 0 cuando no haya enlace entre ellos.

La matriz topológica de adyacencia es cuadrada y esta formada por n filas y n columnas, siendo n el número de átomos o vértices del grafo. Además, es simétrica respecto a su diagonal principal. El grado topológico o la *valencia de cada vértice* δ_i , equivale a la suma de los valores que hay en la fila o en la columna, o lo que es lo mismo el número de ejes que convergen a él.

A continuación en la figura 38 se ilustra la construcción de la matriz topológica para el isopentano y el ciclohexano, junto con los valores obtenidos para las valencias de los diferentes átomos [347].

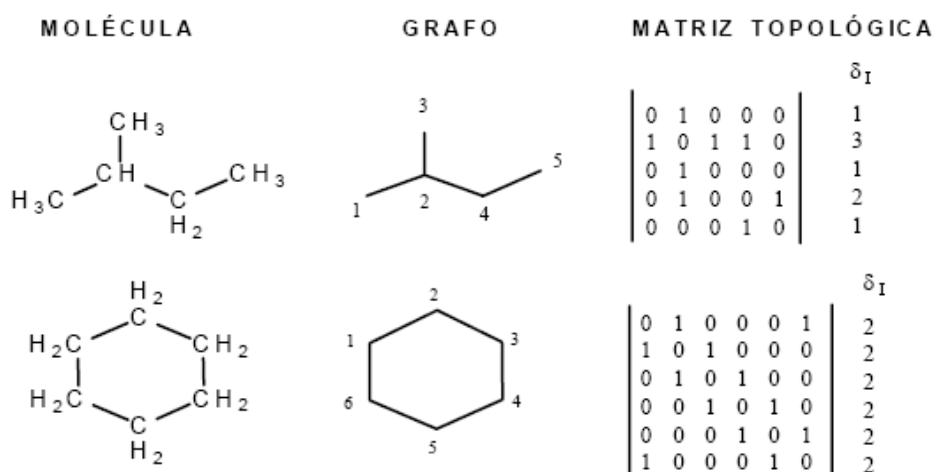


Figura 38. Transformación de un grafo en una matriz de adyacencia.

1.4.3. Índices topológicos

Desde el momento que las estructuras químicas quedan representadas a través de matrices, se obtienen mediante una serie de algoritmos adecuados los llamados índices topológicos.

Estos índices topológicos, son por tanto, descriptores numéricos de la estructura molecular y su principal ventaja es que permiten establecer correlaciones entre ellos y algunas propiedades físicas, químicas o biológicas de las moléculas a estudiar.

El primer índice topológico fue propuesto por Wiener, [348]. Este índice (figura 39) se basa en el concepto topológico de la distancia, entendida como el número de ejes entre dos vértices por el camino más corto. El número de Wiener, que se representa por W , se define como el número total de enlaces entre todos los pares de átomos en el grafo. Para su cálculo se construye la matriz de distancia D , cuyos elementos δ_{ij} se definen como el número de enlaces por el camino más corto desde el vértice i al vértice j . [349].

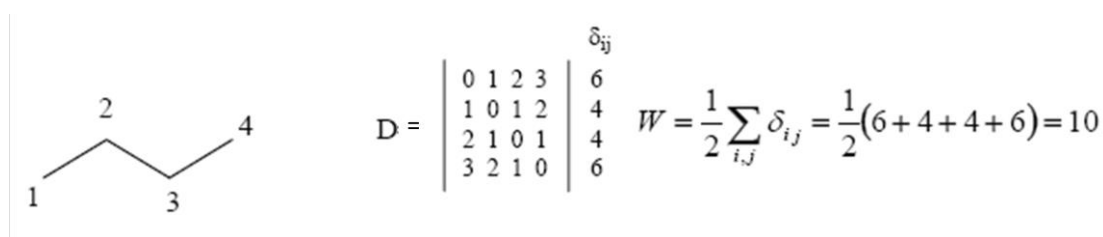


Figura 39. Obtención del número de Wiener para el butano.

Otros muchos índices se han definido desde finales de 1940, entre los que destacan los de Gordon y Scantlebury [350], Hosoya [351], Balaban [352], Randić [353], Bonchev [354], por citar algunos de los más difundidos. Sin embargo, de estudios realizados por Amidon y Anik [355] y completados por Kier y Hall y col. [356], se desprende que los que han demostrado mayor eficacia en diferentes aplicaciones han sido los índices de conectividad molecular, introducidos por Kier y Hall, como generalización del índice de Randić [357] (figura 40).

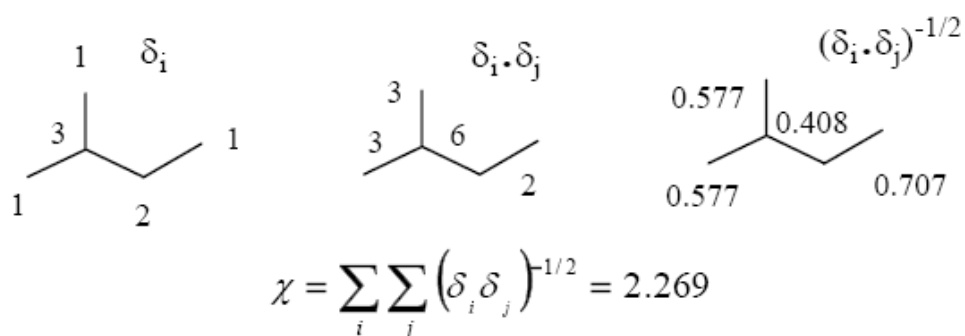


Figura 40. Cálculo del índice de Randić para el metilbutano.

Una vez obtenido el grafo, se sitúan en sus vértices sus valencias topológicas y se multiplican las dos que limitan cada eje del grafo. El índice es la suma de las inversas de las raíces cuadradas de esos productos.

Para el estudio de la predicción de quimioluminiscencia directa por conectividad molecular, se han utilizado índices de conectividad molecular de Kier y Hall de orden $10^m \chi_t$, índices electrotopológicos S_i e índices de carga J_i , cuyo tratamiento matemático excede al contenido de la presente memoria.

1.4.4. Tratamiento informático

La utilización de métodos informáticos es imprescindible para desarrollar las diferentes etapas del estudio de la predicción de quimioluminiscencia fotoinducida por conectividad molecular:

- Cálculo de los índices topológicos.
- Obtención de las funciones discriminantes, mediante el análisis lineal discriminante (ALD).

- Representación de los correspondientes diagramas de distribución de las funciones discriminantes.

1.4.4.1. Obtención de los índices topológicos

El cálculo de los índices se realiza utilizando el programa Desmol 11 [358] [359] y el programa Molconn [360].

La obtención de estos índices se lleva a cabo introduciendo en el programa el grafo completo de cada molécula a estudiar, incluyendo los heteroátomos y a partir de él, se obtienen los descriptores topológicos.

1.4.4.2. Obtención de las funciones discriminantes

Las funciones discriminantes se obtienen empleando un programa del paquete estadístico denominado *BMDP (Biomedicine Department Program)*, creado bajo la dirección de W. J. Dixon [361] en la Universidad de California, con el propósito de realizar un análisis de los datos, tanto para una simple descripción de los mismos como para describir técnicas estadísticas complejas y sofisticadas. Concretamente en los estudios de predicción de quimioluminiscencia directa se utiliza el programa *BMDP 7M*, para la obtención de las funciones de clasificación o discriminación.

Análisis lineal discriminante

Existen propiedades que no están cuantificadas numéricamente, es decir que presentan valores discretos (activo, no activo; alto, medio, bajo etc.) de un parámetro determinado, como puede ser la actividad farmacológica o quimioluminiscente para

cada uno de los compuestos de un grupo de estudio. En estos casos se utiliza el *análisis lineal discriminante* (ALD).

Éste método clasifica un conjunto de objetos numéricamente descriptibles mediante una combinación lineal de variables. Dicha ecuación es capaz de predecir la categoría a la cual pertenece cada objeto.

Entre las operaciones estadísticas realizadas se incluyen:

La lambda de Wilks o U estadística (Wilk's λ), que corresponde a un análisis multivariante de la varianza estadística, para comprobar la igualdad de las medias de grupo para la variable o variables de la función discriminante.

La F (Snedecor) estadística, que es una transformación de la Lambda de Wilks. La selección de variables se realiza por etapas: en la primera, se calculan los parámetros estadísticos F de cada variable y se selecciona aquella que proporciona un valor más alto de F y fuera del intervalo prefijado para su exclusión. El proceso se repite adicionando otras variables a la ecuación de manera que ninguna de las restantes supere la barrera estadística impuesta.

El resultado final en cada caso incluye parámetros tales como la F estadística para las variables elegidas, la lambda de Wilks, D² de Mahalanobis para las media de los grupos, las funciones de clasificación, la matriz de clasificación, la clasificación de Jackknife, porcentajes de clasificación correctos y probabilidades posteriores.

En el análisis lineal discriminante (figura 41) se debe de realizar una validación de la función discriminante, para evaluar la bondad y la calidad del ajuste, aplicándola a un grupo de moléculas no utilizadas previamente. En nuestro caso, utilizamos dos categorías de compuestos: activos e inactivos. Cada categoría se divide aleatoriamente en un grupo de trabajo o de entrenamiento, con el que se obtendrá la función discriminante y otro test o validación cuyos porcentajes de clasificación correcto nos dará una estimación empírica de la bondad del análisis lineal discriminante.

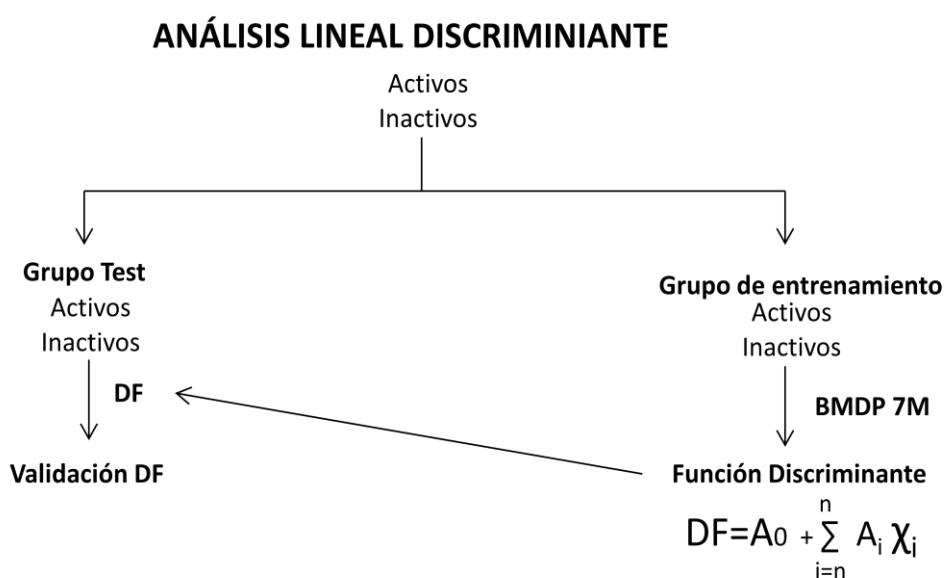


Figura 41. Estrategia del análisis lineal discriminante.

1.4.4.3. Diagramas de distribución

Los diagramas de distribución desarrollados en la unidad de investigación de Conectividad Molecular y Diseño de Fármacos de la Facultad de Farmacia de la Universitat de València [362] son representaciones en forma de histograma que aportan información sobre la eficacia de la función discriminante y permiten evaluar la

expectativa o la probabilidad de actividad para un compuesto en un intervalo de la función discriminante. Estos diagramas de actividad han sido útiles para revelar la actividad farmacológica en diversos fármacos como broncodilatadores, antimicrobianos y antimaláricos.

Dado un intervalo arbitrario de la función discriminante podemos definir en él la expectativa o la probabilidad de actividad quimioluminiscente como:

$$E_a = \frac{a}{i + 1}$$

Donde “a” es el cociente resultante de dividir el número de compuestos activos en dicho intervalo por el número total de compuestos activos, mientras que “i” es el cociente entre el número de compuestos inactivos en el intervalo estudiado y el número total de compuestos inactivos. Análogamente se puede definir la expectativa de inactividad quimioluminiscente para un determinado intervalo de la función discriminante como:

$$E_i = \frac{i}{a + 1}$$

Dado que se trabaja con un grupo de entrenamiento y otro de test o validación, se puede definir de idéntica manera la expectativa de actividad e inactividad para el grupo test, E_{t_a} y E_{t_i} respectivamente. Los diagramas de distribución son diagramas de distribución de frecuencias de una variable dependiente, en cuya ordenada se

representa la expectativa de una actividad para cada intervalo de la función discriminante.

La principal ventaja de estos diagramas es que permiten determinar visualmente aquellos intervalos de la función donde la probabilidad de encontrar nuevos compuestos activos sea máxima frente a la posibilidad de dar un falso positivo. En la figura 42 se refleja un diagrama de distribución tipo.

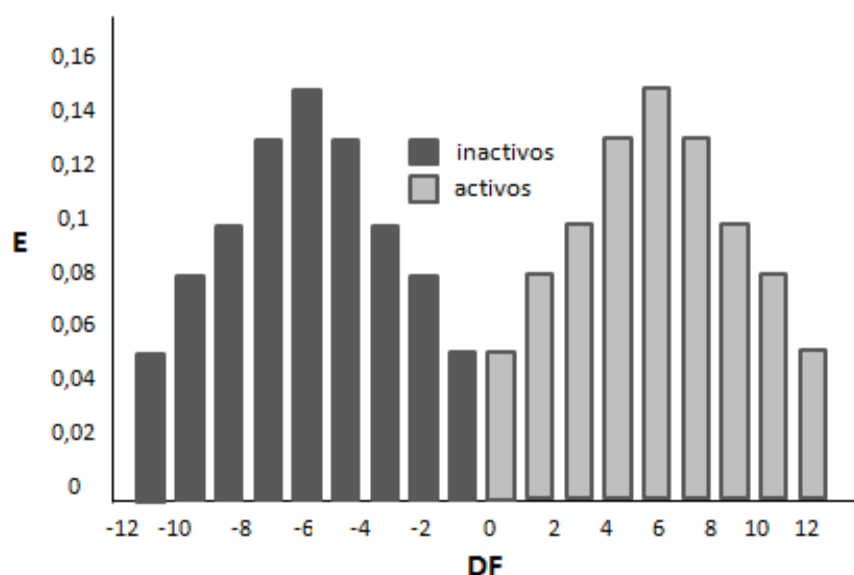


Figura 42. Diagrama de distribución "tipo".

1.4.5. Aplicaciones de la conectividad molecular a la Química Analítica

La topología molecular ha demostrado su utilidad en las áreas química y farmacéutica. Se ha usado para la predicción propiedades físicas como la viscosidad [363] y propiedades físico-químicas [364-367]. También se ha aplicado a distintos grupos terapéuticos con la finalidad de obtener nuevas funciones de predicción, entre ellos: antivirales [368-369], betabloqueantes [370], analgésicos [371-372],

broncodilatadores [373,374], sedantes [375], antifúngicos [376], antitoxoplasma [377], antibacterianos [378], antihistamínicos [379] e hipoglucémicos [380].

En Química Analítica la conectividad molecular se ha aplicado preferentemente a la predicción de propiedades cromatográficas relacionadas con la cromatografía de capa fina, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) [13] y la cromatografía de gases (GC) [14, 381].

En el estudio de los parámetros cromatográficos, la conectividad molecular ha permitido elaborar modelos de predicción para el tiempo de retención (t_r) y los índices de retención (R_i) para la cromatografía de gases y (R_f) para la cromatografía de capa fina, así como su relación con la polaridad del disolvente.

La conectividad molecular se ha empleado en mucha menor medida en la predicción de otras propiedades de interés analítico, tales como la quimioluminiscencia y la fluorescencia (tabla 10).

Propiedad química	Analito	Referencia
Quimioluminiscencia	Alcaloides	[382]
Quimioluminiscencia	Fármacos	[383]
Fluorescencia	Fármacos	[384]
Quimioluminiscencia	Antígeno prostático	[385]
Quimioluminiscencia	Fenoles y polifenoles	[386]
Quimioluminiscencia	Difenamida	[387]
Quimioluminiscencia	Pesticidas	[388]

Tabla 10. Propiedades químicas estudiadas en la bibliografía con conectividad molecular.

CAPÍTULO II

OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

CAPÍTULO II

OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

2.1. Objetivos

Los trabajos presentados en esta memoria corresponden a los siguientes objetivos fundamentales:

- Implementación de dispositivos solenoides (válvulas y bombas) en el desarrollo de nuevas estrategias de análisis en flujo continuo (multiconmutación y multibombeo) que permitan el diseño de sistemas en flujo activos, disminuir el consumo de muestra y reactivos, sustituir los “volúmenes” de inserción por “tiempos de inserción”, y un mejor control de la dispersión de la muestra y de los reactivos, como una alternativa al FIA más eficiente en términos de automatización.
- Explorar el potencial analítico de la quimioluminiscencia empleando nuevas metodologías de flujo: acoplamiento QL-multiconmutación-multibombeo aplicado al análisis de pesticidas en muestras mediambientales.
- Aplicación de la conectividad molecular a la predicción de nuevas propiedades químico-físicas de interés analítico.

Con una mayor concreción, los trabajos recogidos en la presente memoria obedecen a los siguientes objetivos:

- Empleo de la metodología de flujo por multiconmutación para el desarrollo un screening de pesticidas evaluando su fotodegradabilidad y respuesta quimioluminiscente.
- Aplicación de métodos de conectividad molecular en la predicción de la propiedad quimioluminiscencia-fotoinducida en pesticidas.
- Implementación de los procesos de fotodegradación en sistemas de flujo continuo con detección quimioluminiscente, con la finalidad de ampliar el número de moléculas (pesticidas) susceptibles de ser determinadas mediante métodos analíticos sensibles basados en la detección quimioluminiscente.
- La aplicación analítica de los métodos desarrollados a la determinación de pesticidas en formulaciones técnicas, así como en muestras de interés medioambiental como el agua, ya que las disposiciones legales en cuanto a la calidad de los productos mediambientales y de las aguas son cada vez más estrictas.

2.2. Plan de trabajo

Las determinaciones quimioluminiscentes de los pesticidas presentados en esta memoria (capítulos VI y VII) así como la aplicación de la conectividad molecular a la predicción de la propiedad quimioluminiscencia-fotoinducida (capítulo V), se basan en la información obtenida en un amplio screening experimental de 163 pesticidas cuyos resultados se describen con detalle en el capítulo IV. Referencia obligada en el desarrollo previo del sistema de flujo empleado en el barrido experimental es el trabajo realizado en este laboratorio por Palomeque y col. [199], en el cual se puso a

punto un sistema de flujo basado en multiconmutación con detección quimioluminescente y fotodegradación en línea para la determinación del pesticida aldicarb en aguas y formulaciones técnicas. En el mencionado trabajo se establecieron tanto la configuración física del montaje de flujo (número de líneas, número y disposición de los elementos solenoide, naturaleza del fotorreactor) (ver figura 43), como la configuración lógica del mismo (perfil de multiconmutación o secuencias de pulsación de los dispositivos solenoide) y las características químicas (disolución de oxidante, medios de fotodegradación, etc).

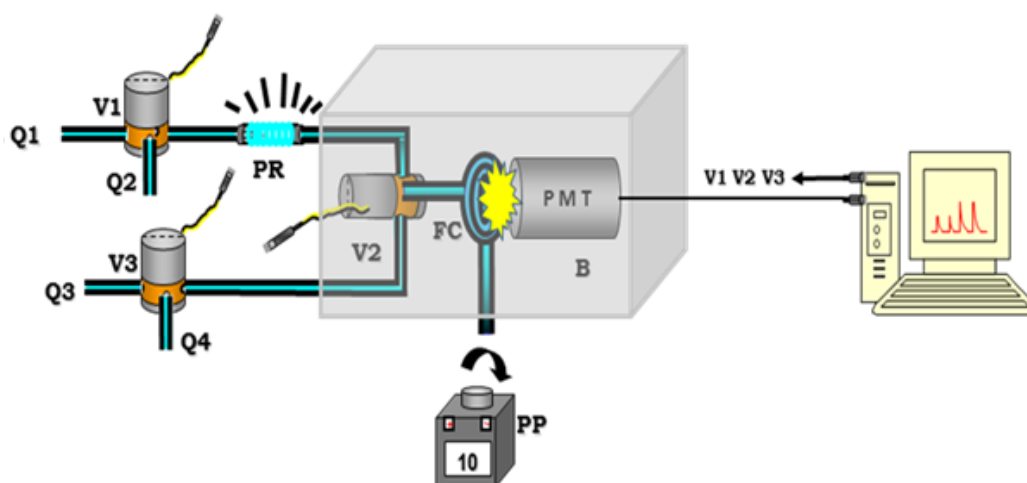


Figura 43. Esquema del montaje en flujo de multiconmutación para la determinación de pesticidas por quimioluminiscencia fotoinducida.

(Q1: Disolución muestra, Q2: Medio de fotodegradación, Q3: Portador, Q4: Solución oxidante, PR: Fotorreactor, FC: Celda de flujo en espiral, PMT: tubo fotomultiplicador, PP: Bomba peristáltica, V1, V2, V3: Válvulas solenoides)

La abundante información obtenida en el barrido experimental permitió alimentar el modelo predictivo de conectividad molecular que constituye el capítulo V de la presente memoria. Concretamente, para realizar el estudio se utilizaron 72 pesticidas estructuralmente heterogéneos. Estos comprenden un grupo de inactivos, sin actividad quimioluminescente reconocida (pesticidas que no presentan

quimioluminiscencia sin y con fotoirradiación); y un grupo de activos, con actividad quimioluminiscente probada (pesticidas quimioluminiscentes que, o bien aumentan fuertemente la quimioluminiscencia al ser fotoirradiados, o se convierten en quimioluminescentes después de la irradiación). Siguiendo el esquema de la figura 37, se obtuvieron los índices topológicos para cada una de las 72 moléculas; se aplicó el análisis lineal discriminante para la obtención de la función discriminante; y se validó la función discriminante haciendo uso de los grupos de entrenamiento y grupos de prueba o test en los que fueron subdivididos los grupos de activos e inactivos. Finalmente, la bondad de la función discriminante se confirmó al aplicar ésta a estructuras no empleadas en el desarrollo y validación de la función, confirmando experimentalmente, mediante pruebas en el sistema de flujo de multiconmutación, para los pesticidas teóricamente clasificados como activos, la buena correlación de las predicciones.

En los capítulos VI y VII que completan los trabajos incluidos en la presente memoria, se proponen sendos montajes de flujo por multiconmutación y multibombeo para la determinación de imidazolinonas y auxinas por quimioluminiscencia inducida y directa, respectivamente. En ambos trabajos se sigue el mismo esquema para el plan de trabajo, el cual consiste en las siguientes etapas: ensayos previos, optimización del sistema de flujo y aplicaciones analíticas.

Ensayos previos

Se realizaron experiencias encaminadas a la obtención de información cualitativa y semicuantitativa sobre el sistema quimioluminiscente empleado, así como sobre la idoneidad de la configuración física y lógica del sistema de flujo utilizado.

Estos estudios previos conducen a unos valores de las variables químicas y de flujo del sistema, que proporcionan señales analíticas de “calidad”, en términos de sensibilidad y reproducibilidad, si bien manifiestamente mejorables tras una etapa de optimización. Tras estos estudios se selecciona el sistema oxidante, se obtiene una primera estimación del tiempo y medio de fotodegradación (determinación de imidazolinonas), se establece la arquitectura del sistema de flujo, o lo que es lo mismo, la disposición de los distintos elementos de multiconmutación, y el perfil previo de multiconmutación, es decir, la secuencia de pulsos que determina el orden de activación de cada una de las válvulas o bombas solenoide, así como la duración de los pulsos, que determina el tiempo que permanece activo cada elemento.

Optimización del sistema de flujo

Tras adecuar las experiencias realizadas en los ensayos previos a un sistema de multiconmutación/multibombeo, se procedió a optimizar las distintas variables mediante un procedimiento de aproximaciones sucesivas atendiendo a criterios de sensibilidad, reproducibilidad y velocidad de inserción. A lo largo de toda la etapa de optimización se empleó un método univariante: se modifica el valor de la variable a

optimizar dentro de un intervalo predefinido, manteniendo constantes el resto de las variables del sistema, tanto las variables químicas como las variables de flujo.

En la etapa de optimización se estudió la influencia de la concentración y medio del sistema oxidante, de fotosensibilizadores en el proceso de fotoirradiación, y de sensibilizadores o *enhancers* de la reacción quimioluminiscente; y en el caso de la quimioluminiscencia fotoinducida, también el tiempo de fotoirradiación de la muestra.

En la optimización de las variables de flujo, se optimizó el caudal y el perfil de multiconmutación (secuencia, duración y frecuencia de pulsos).

Aplicaciones analíticas

En este apartado se determinaron, en primer lugar, las características analíticas del método, como son: el intervalo linealidad, los límites de detección, la velocidad de inserción, la repetitividad y la reproducibilidad.

Seguidamente, se realizó un estudio de la influencia de los posibles interferentes, lo cual permitió conocer la tolerancia del método frente a compuestos comúnmente presentes en las muestras de estudio.

Por último, se procedió a la determinación del analito en las respectivas muestras reales.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

3.1.1. Instrumentación analítica

El instrumental analítico empleado en las distintas etapas del trabajo experimental fue el que se describe a continuación:

- Luminómetro de fabricación propia constituido por una caja hermética a la luz en cuyo interior se ubican los siguientes componentes:
 - Tubo fotomultiplicador (PMT) P30CWAD5F-29 Tipo 9125 con rango espectral (280 – 630 nm), suministrado por Electron Tubes Limited (<http://www:et-enterprises.com/>), que funciona a 1280 V. El tubo fotomultiplicador se conecta externamente a un módulo *counter-timer* CT2, también suministrado por Electron Tubes Limited, que convierte al PC en un instrumento de alto rendimiento para contar pulsos.
 - Celda de flujo de cuarzo de fabricación artesanal y 1 mm de diámetro interno, en forma de espiral plana, sin dejar huecos entre las espiras, con un diámetro total de 3 cm. La espiral plana se dispone lo más cerca posible de la ventana del tubo fotomultiplicador, y en la cara opuesta de la celda se sitúa una superficie reflectante para asegurar la máxima captación de luz.

- Balanza analítica modelo BP110S, de Sartorius.
- Controlador de dispositivos solenoide (válvulas y microbombas) de KSP Measurement System, Bialystok, Poland, conectado a un ordenador Pentium con un sistema operativo Windows 98.

3.1.2. Material FIA, multiconmutación y multibombeo

- Bomba peristáltica Miniplus Gilson 2 (Columbus, OH, EE.UU).
- Válvulas solenoides (modelo 161T031, NResearch, Northboro, MA, EE.UU).
- Válvulas solenoide (modelo 075T3MP12-32-5P, Bio-Chem Fluidics).
- Bombas solenoides (modelo 090SP12-8 y 120SPI12-50 de Bio-Chem Fluidics, West Caldwell, NJ, USA).
- Tuercas, conexiones y roscas de PTFE, de Omnifit.
- Tubo de Tygon® para bomba peristáltica, de Omnifit.
- Tubo PTFE de 0,8 mm de diámetro interno, 1.6 mm diámetro externo de Omnifit.
- Lámpara de mercurio de baja presión de 20 W de potencia (Zalux).

3.1.3. Software

- KSP *Measurement System*, para programar los perfiles de pulsación (activación-desactivación) de válvulas y bombas solenoide.

- EM6 *Counter Timer* para la adquisición y tratamiento de datos con el luminómetro (Electron Tubes Limited).
- Molconn [389] y Desmol11 [358] para el cálculo de descriptores e índices topológicos.
- BMDP 7M Statistical [361] para la selección de la función de conectividad.

3.1.4. Reactivos

El agua empleada en la preparación de las disoluciones acuosas fue purificada por ósmosis inversa y posteriormente desionizada (18 MΩ cm) con un sistema de cartuchos de intercambio iónico modelo Barnstead/Sybron Nanopure II. Todos los patrones de pesticidas se obtuvieron de Dr. Ehrenstorfer (Ausburgo, Alemania). Se prepararon instantes antes de su utilización y se preservaron de la luz ambiental durante todo el proceso de medida. Los reactivos utilizados en el desarrollo experimental, todos ellos de calidad analítica, fueron los que se detallan a continuación:

Estudio de la quimioluminiscencia fotoinducida de pesticidas.

KMnO₄ (Panreac) y H₂SO₄ 96% (Panreac) fueron empleados en la preparación de las disoluciones de oxidante. Los medios de fotodegradación se prepararon a partir de NaOH (Panreac), H₂O₂ (Panreac), Fe(NO₃)₃·9H₂O (Probus) y FeSO₄·7H₂O (Fluka).

Estudio de la quimioluminiscencia fotoinducida para imidazolinonas.

Los ácidos minerales y álcalis, KMnO_4 y H_2O_2 , empleados en los ensayos preliminares fueron todos de Panreac; $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (Probus), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Fluka). Acetona (Guinama), sulfato de quinina, rodamina B y 6G (de Sigma-Aldrich), β -ciclodextrinas (Fluka), ácido fórmico, acetonitrilo, 1,4-dioxano y dimetilformamida (todos de Panreac), tetrahidrofurano (THF) y Triton X-100 (Scharlau), dodecil sulfato sódico (SDS), cloruro de hexadecil piridinio (Fluka), etanol (Prolabo), respectivamente, se ensayaron como potenciadores de quimioluminiscencia. Los cationes probados como posibles interferencias inorgánicas se prepararon a partir de cloruro (Co(II), Cu(II)), y las sales de sulfato (Mn (II), Zn (II), Mg (II)) (todos de Panreac). KHCO_3 y NH_4HCO_3 (Panreac). Los aniones de las sales sódicas fueron también de Panreac.

Estudio de la quimioluminiscencia directa en auxinas.

Los ácidos minerales, NaOH (Scharlau), H_2SO_4 (Scharlau), KMnO_4 (Baker), $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (Panreac), N-Bromosuccinimida (Scharlau), y $(\text{NH}_4)_2\text{Ce}(\text{NO}_3)_6$ (Fluka) fueron utilizados en los estudios sobre la influencia de los sistemas oxidantes. Acetona (Guinama), sulfato de quinina, rodamina B y 6G (todos Sigma-Aldrich), β -ciclodextrinas (Fluka), ácido fórmico, acetonitrilo, 1,4-dioxane y dimetilformamida (todos de Panreac), tetrahidrofurano (THF) y Triton X-100 (Scharlau), dodecyl sulfato sodico (SDS), cloruro de hexadecyl pyridinium (Fluka), etanol (Prolabo), respectivamente, se ensayaron como potenciadores de quimioluminiscencia. Cationes y aniones para el estudio de interferencias fueron preparados a partir de diferentes sales: NaCl, NaNO_2 , CaSO_4 ,

NiSO_4 , Na_2SO_4 , NaNO_3 , NaHCO_3 (Panreac), y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgSO_4 , acetato de sodio, KCl, NaH_2PO_4 (Scharlau).

3.2. Métodos

3.2.1. Proceso de optimización

En todos los trabajos se utiliza una secuencia de optimizaciones consecutivas usando el método univariante.

En cada trabajo experimental se realiza una optimización de variables físico-químicas (tipo de sistema oxidante, concentración del sistema oxidante, medio de preparación del oxidate,...) y de las variables de flujo del sistema (caudal, volumen de muestra insertado, perfil de multiconmutación, tiempo de fotodegradación, tipo de bomba solenoide,..), dependiendo estas variables de flujo de la metodología empleada (multiconmutación o multiconmutación/multibombeo).

3.2.2. Optimización del sistema de flujo

Determinación de imidazolinonas por quimioluminiscencia fotoinducida

La optimización se realizó de la siguiente manera:

La bomba peristáltica se colocó después del detector y la muestra y los reactivos fueron conducidos al detector por un flujo de aspiración; este caudal producido por la

bomba peristáltica se optimiza hasta obtener el mejor compromiso entre la intensidad de emisión quimioluminiscente y la reproducibilidad.

Las válvulas solenoides actúan de forma independiente. La forma de trabajo de una válvula se describe en sus perfiles de inserción, donde se optimizan las variables N y t_i vía software, $N(t_1, t_2)$, donde t_1 es el tiempo de la válvula en ON, y t_2 el tiempo de la válvula en OFF, y N es el número de pulsos o ciclos ON/OFF. Cambios en la configuración lógica del sistema de flujo afectan solo al número y longitud de los pulsos (tiempo ON/tiempo OFF) de cada válvula solenoide. La reconfiguración del sistema de flujo se consigue *via software*, alterando los parámetros mencionados. Para cada perfil de inserción se obtiene una señal analítica transitoria en forma de pico.

La optimización se realizó para cada válvula, primero el número de inserciones (N), y una vez fijado éste, se optimizó la proporción de mezclado (t_1, t_2).

Determinación de auxinas por quimioluminiscencia directa

La optimización se realizó de la siguiente manera:

Las bombas solenoides son las que producen el flujo pulsante, y se ubican en la cabecera del sistema de flujo. Estas producen un régimen de pulsos que vienen determinados por el tamaño de la bomba (volumen bombeado por pulso, 8, 25, 50 μL /pulso), y por la frecuencia de los pulsos, con lo cual se puede prefijar el volumen que se desea insertar en cada punto del montaje, siendo éste un múltiplo del volumen establecido de fábrica para cada bomba. El volumen insertado se optimizó

modificando el tamaño de la bomba, el número de pulsos (N) y la frecuencia de las pulsaciones (t_1, t_2).

La proporción de la disolución de pesticida y de la disolución de oxidante se reguló también por medio de una válvula solenoide sincronizada con los pulsos de sendas bombas solenoide. En el montaje se combinaron las bombas solenoides, que son las que introducen por cada línea o canal del sistema cada una de las disoluciones, con una válvula solenoide que actúa como un conmutador de flujo, seleccionando la disolución de pesticida u oxidante de acuerdo con su propia secuencia de multiconmutación, $N(t_1, t_2)$, la cual fue sometida a un proceso de optimización: número de ciclos ON/OFF (N) y tiempo ON/OFF (t_1 y t_2). Cada combinación N, t_1 , t_2 determina un patrón de mezclado característico.

CAPÍTULO IV
ESTUDIO DE LA
QUIMIOLUMINISCENCIA
FOTOINDUCIDA EN PESTICIDAS

CAPÍTULO IV

ESTUDIO DE LA QUIMIOLUMINISCENCIA FOTOINDUCIDA EN PESTICIDAS

4.1. INTRODUCCIÓN

El presente trabajo de la memoria aúna los distintos tópicos analíticos expuestos con detalle en los capítulos precedentes: la detección quimioluminiscente, la luz como reactivo analítico y el empleo de metodologías recientes de flujo como la multiconmutación, que permiten una plena automatización de los sistemas de flujo. El potencial analítico de esta combinación se focaliza en analitos de gran interés medioambiental como son los pesticidas.

El acoplamiento de UV-fotorreactores, permite un tratamiento on-line de la muestra, favoreciendo la formación de especies excitadas y fotofragmentos susceptibles de experimentar quimioluminiscencia con los reactivos adecuados, tales como oxidantes fuertes (quimioluminiscencia directa), permitiendo la detección y determinación de moléculas que no presentaban inicialmente quimioluminiscencia nativa.

La viabilidad de esta hipótesis de trabajo se pretende confirmar mediante la realización de un amplio barrido de pesticidas (163 pesticidas) estructuralmente muy heterogéneos de las familias más relevantes (auxinas, carbamatos, imidazolinonas, organofosforados, triazinas, ureas, etc.).

El diseño del sistema de flujo, en lo que compete tanto a la configuración física o arquitectura del mismo, como a la configuración lógica o perfil de multiconmutación, deben atenerse a los siguientes requerimientos operativos:

- El control de los tiempos de fotoirradiación debe ser muy preciso, y permitir una variación dentro de un intervalo razonablemente amplio (desde unos segundos a varios minutos). La alternativa más interesante sería poder irradiar la disolución de pesticida en condiciones de flujo detenido o *stopped-flow*.

- La reducción del consumo de las disoluciones de pesticida y reactivo oxidante debe ser prioritaria, de forma que se cumpla con los principios básicos de la *Green Chemistry*, minimizando los residuos tóxicos. En este sentido, se debe evitar especialmente el flujo continuo de las disoluciones de pesticida; y también, en la medida de lo posible, de la disolución de oxidante. La estrategia de flujo detenido sugerida anteriormente sería una buena opción, pero además, ambas disoluciones deberían poder mezclarse tras la etapa de fotoirradiación del pesticida de forma efectiva en un punto del sistema muy próximo a la celda de flujo del luminómetro. El elevado precio de los estándares de pesticidas hace también prioritaria la minorización de su consumo durante el desarrollo del barrido.

- El sistema de flujo debe contemplar la posibilidad de llevar a cabo tanto el proceso de fotoirradiación como la detección quimioluminiscente, los cuales requieren tiempos de ejecución muy diferentes (del orden de minutos para el primero y segundos para la emisión quimioluminiscente). Un sistema con líneas independientes,

que confluyan solamente después de la fotoirradiación se hace necesario. El caudal durante la reacción quimioluminescente debería ser alto debido a la rápida cinética de la reacción, y la bomba peristáltica tendría que funcionar ininterrumpidamente para garantizar una buena reproducibilidad del caudal, ya que en caso de optar por desactivarla durante el proceso de fotoirradiación y reactivarla para el mezclado de las disoluciones de pesticida y oxidante, habría que contar con un tiempo adicional para que la bomba peristáltica adquiriese un régimen estable de funcionamiento.

4.1.1. Montaje de flujo continuo

Con las consideraciones previas se diseñó el sistema de flujo cuyo esquema se muestra en la figura 44, que fue empleado en la realización del barrido o *screening* de pesticidas. El montaje de flujo estaba compuesto por tres válvulas solenoides modelo 161T031 (NResearch); las válvulas fueron conectadas a un controlador tipo KSP cuyo accionamiento fue programado usando un software casero que se ejecutó desde un ordenador Pentium con un sistema operativo Windows 98. El programa y la interfase permiten un control de cada una de las válvulas solenoides de forma independiente. Una bomba peristáltica Gilson Minipuls 2 provista de un tubo de Tygon se emplazó después de la celda de flujo para aspirar las disoluciones de pesticida y reactivos. Las conexiones entre los diferentes componentes del sistema de flujo se realizó con tubo de Teflón (PTFE) de 0,8 mm de diámetro interno y 1,6 mm de diámetro externo. El fotorreactor consistió en 150 cm de tubo de Teflón enrollado helicoidalmente alrededor de una lámpara de mercurio de baja presión (Zalux) de 20W de potencia.

Una de las válvula solenoide (V2) se empleó para obtener un mezclado eficiente de las disoluciones de pesticida y oxidante después de la etapa de fotoirradiación, y fue conectada directamente a la celda de flujo en el interior del luminómetro (ver apartado 3.1.1. de Materiales y Métodos).

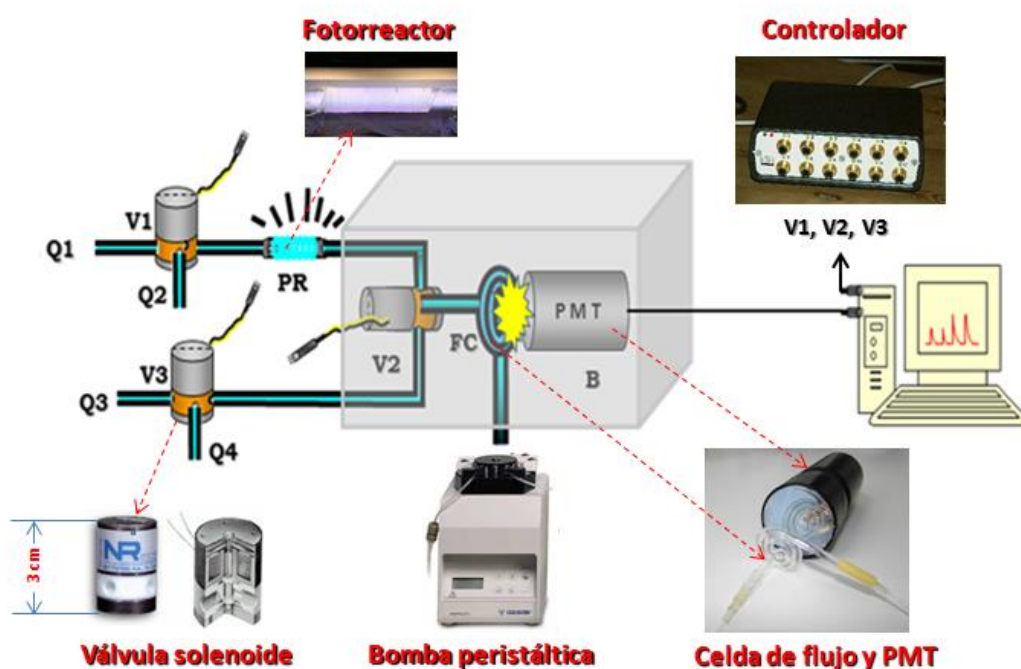


Figura 44. Esquema del montaje en flujo de multiconmutación para la determinación de pesticidas por quimioluminiscencia fotoinducida. (Q1: Disolución de pesticida, Q2: Medio de fotodegradación, Q3: Portador, Q4: Solución oxidante, PR: Fotoreactor, FC: Celda de flujo en espiral, PMT: tubo fotomultiplicador, PP: Bomba peristáltica. V1, V2, V3: Válvulas solenoides).

4.1.2. Perfil de multiconmutación

El perfil de multiconmutación se puede apreciar en la figura 45. En primer lugar, se introducen en el sistema de flujo de N microinserciones alternadas de pesticida y medio de fotodegradación. Durante cada microinserción V_1 permanece activada durante t_1 (válvula ON, el pesticida es aspirado por Q_1), y desactivada durante t_2

(válvula en OFF, el medio de fotodegradación es aspirado por Q_2). Se lleva a cabo el llenado del fotorreactor durante 30 segundos; en este tiempo V_2 permanece en ON, permitiendo que el fotorreactor se llene de la mezcla pesticida-medio de fotodegradación. Este tiempo de llenado se usa para lavar las paredes internas del fotorreactor evitando así la contaminación cruzada. A continuación, V_1 y V_2 son conmutadas simultáneamente (OFF), deteniendo el flujo (*stopped flow*) de la mezcla pesticida-medio de fotodegradación durante 150 s (tiempo de fotoirradiación). Durante este intervalo de tiempo a través de la celda fluye agua desionizada como disolución portadora Q_3 (V_3 en OFF). Previa a la reacción de quimioluminiscencia ($t = 165$ s), el reactivo quimioluminiscente ($KMnO_4$ (Q_3)) es transportado a V_2 (V_3 en ON). Después del tiempo de parada de flujo, V_2 es activada, alternando microsegmentos del pesticida fotodegradado con el reactivo quimioluminiscente. Al final del ciclo completo de multiconmutación se obtiene una señal transitoria en forma de pico. Las disoluciones de cada uno de los canales del sistema de flujo son aspiradas a un caudal de 10 mL min^{-1} por la bomba peristáltica emplazada después de la celda de flujo.

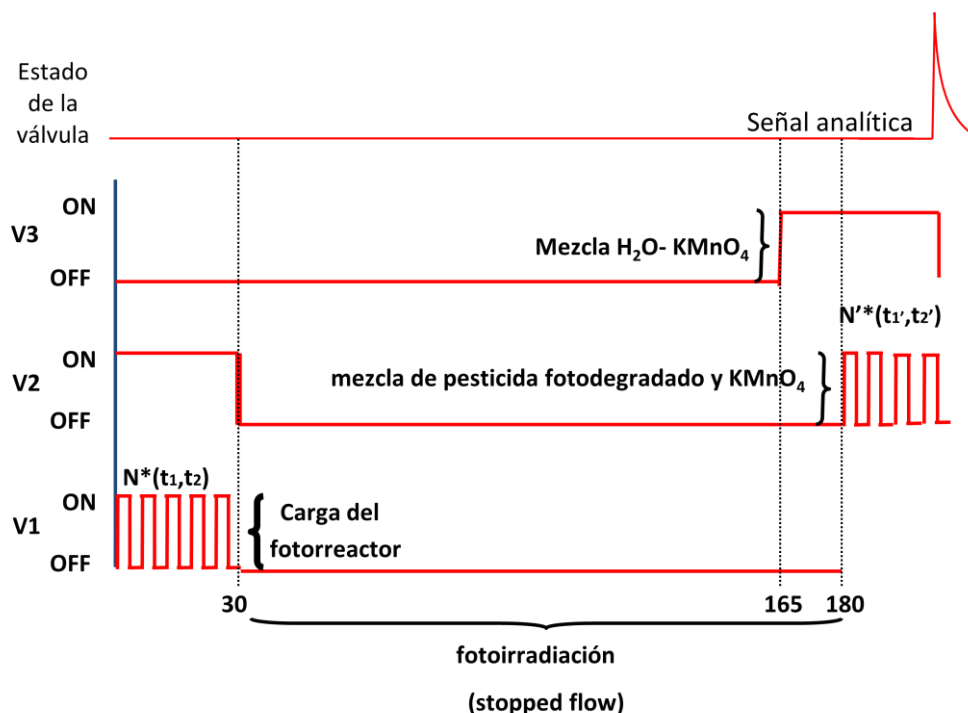


Figura 45. Esquema del perfil de inserción para un ciclo.
 $[V_1=50*(0.4,0.2); V_2=0,30(\text{ON}),150(\text{OFF}),30*(0.6,0.2); V_3=165(\text{OFF}),39(\text{ON})]$.

4.1.3. Selección de parámetros químicos y físicos

Los parámetros químicos y físicos comprenden el medio de fotodegradación, el sistema oxidante empleado en la detección quimioluminiscente, el perfil de multiconmutación y el tiempo de fotoirradiación UV.

Se estudió la fotodegradación de los pesticidas en diferentes medios combinados con la detección quimioluminiscente. El estudio de los medios de fotodegradación se focalizó en especies químicas que forman radicales hidroxilo al ser irradiadas con luz ultravioleta y que posteriormente reaccionan con contaminantes orgánicos de una manera no selectiva, dando lugar a una eficiente degradación fotocatalítica del pesticida [390]; NaOH, Fe(II), H₂O₂ empleados en la reacción de foto-Fenton [391-392],

y Fe(III), que forma acuocomplejos descritos como un eficiente sistema fotocatalizador en la mineralización de pesticidas bajo irradiación solar [393], fueron también testeados.

El sistema oxidante permanganato/ácido, da lugar a emisión de luz en muchos compuestos, por ello es presentado como el oxidante mas eficiente en fase líquida en muchos procesos quimioluminiscentes. La razón de este comportamiento está asociado con el mecanismo de generación de quimioluminiscencia por el permanganato potásico. Diferentes autores [394] han contribuido a explicar este proceso. De acuerdo con Barnett, parece que el responsable de la quimioluminiscencia es el estado excitado de una especie del Mn(II). Estas hipótesis parecen ser verificadas por la mejora de los efectos de los polifosfatos en la emisión quimioluminiscente usando KMnO_4 como oxidante. El excelente comportamiento del permanganato potásico asociado a los procedimientos de quimioluminiscencia directa parece ser debido a un inusual caso de fosforescencia a temperatura ambiente.

Por otra parte, el comportamiento del permanganato requiere especial cuidado en la selección de la concentración. La señal muestra un perfil parabólico, aumentando la emisión quimioluminiscente con la concentración, para decaer posteriormente debido a un proceso de autoabsorción de la propia disolución coloreada. En base a trabajos previos de este equipo de investigación [aldicarb ($5 \cdot 10^{-4}$ mol L^{-1}) [199]; screening medicamentos ($2 \cdot 10^{-4}$ mol L^{-1}) [8]; asulam ($2 \cdot 10^{-4}$ mol L^{-1}) [198]; tiazidas ($7,2 \cdot 10^{-4}$ mol L^{-1}) [395]; sulfonamidas ($7 \cdot 10^{-4}$ mol L^{-1}) [396]; tiamina ($4 \cdot 10^{-4}$ mol L^{-1}) [397]; acriflavina ($2 \cdot 10^{-4}$ mol L^{-1}) [398], en los cuales se empleó el permanganato potásico en medio

ácido en el desarrollo de métodos en flujo con quimioluminiscencia directa, la concentración seleccionada para efectuar el barrido fue de $7 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de KMnO_4 en H_2SO_4 2 mol L^{-1} , para la cual se garantiza una mayor robustez química.

El perfil de inserción se representa en la figura 46. La disolución de pesticida Q_1 (blanco o disolución acuosa de pesticida, $2,62 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) es mezclado con el medio de fotodegradación Q_2 (H_2O , $\text{NaOH } 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, H_2O_2 0,05%, $\text{Fe(III) } 6 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $\text{Fe(II) } 6 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$). La mezcla es obtenida multiconmutando V_1 ($50 \cdot (0.4, 0.2)$). Posteriormente a estas microinserciones de pesticida-medio, V_1 es conmutada a OFF y el flujo se detiene durante 150 s. Durante 135 segundos del ciclo (165-30), agua desionizada (Q_3) es aspirada y circula por la celda de flujo. V_3 es activada (ON) 15 segundos antes de finalizar la fotoirradiación del pesticida de forma que la disolución de oxidante Q_4 (KMnO_4 $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ / H_2SO_4 2 mol L^{-1}) rellene el tramo del sistema comprendido entre V_3 y V_2 . A continuación, V_2 , es activada ($30 \cdot (0.6, 0.2)$) y 30 inserciones de medio-pesticida fotoirradiado (V_2 ON, 0.6 s) se alternan con la disolución de oxidante (V_2 OFF, 0.2s).

El perfil seleccionado fue: $V_1=50 \cdot (0.4, 0.2)$; $V_2=30(\text{ON}), 150(\text{OFF}), 30 \cdot (0.6, 0.2)$; $V_3=165(\text{OFF}), 39(\text{ON})$. Es importante insertar gran número de segmentos (N) por medio de V_1 (50), debido a que el fotorreactor es de gran longitud (150 cm); y también, a través V_2 (30), para asegurar una mezcla efectiva entre la disolución fotodegradada con la disolución de oxidante, así como para llenar con la mezcla la totalidad de la celda de flujo. Los valores de $t_1/t_2 > 1$ en V_1 y V_2 permiten evitar la excesiva disolución del pesticida en el medio en V_1 o con el oxidante en V_2 .

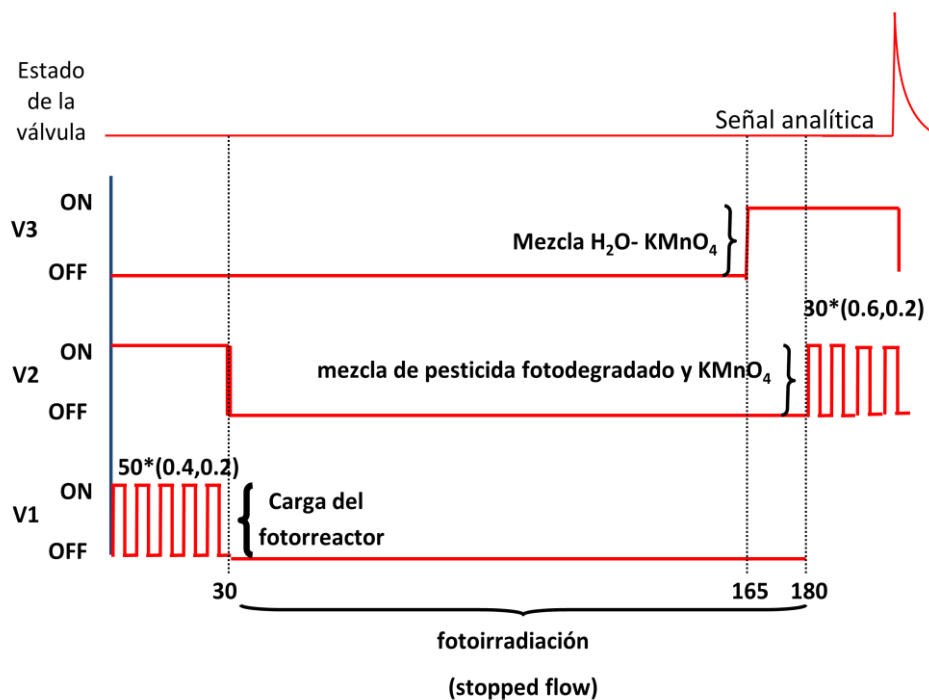


Figura 46. Perfil de inserción para la determinación quimioluminiscente de pesticidas.

Todas las disoluciones fueron aspiradas a un caudal de 10 mL min^{-1} . Caudales inferiores a 6 mL min^{-1} fueron descartados debido a la rápida cinética de la reacción quimioluminiscente.

El estudio del efecto del tiempo de exposición a la luz UV se realizó cambiando el tiempo de stopped-flow (tiempo de V₂ en OFF). Dado el número y la heterogeneidad de estructuras moleculares que se abordan en el screening de pesticidas, el tiempo de fotoirradiación seleccionado fue de 150 s. Se trata de un tiempo de compromiso: permite obtener una velocidad de barrido operativa, no excesivamente baja, y supone un tiempo suficiente para conseguir una fotodegradación total o parcial de los pesticidas más resistentes a la fotólisis.

Trabajos previos de fotoquimioluminiscencia fotoinducida desarrollados por nuestro equipo de investigación, y aplicados a la determinación de fármacos [8] y pesticidas [198-199] proporcionaron tiempos de fotodegradación comprendidos entre 40 y 150 segundos. Más del 80% de los tiempos de fotodegradación de la tabla 9, que recoge los trabajos publicados hasta la fecha sobre quimioluminiscencia fotoinducida de pesticidas, se encuentran entre 67 y 150 segundos.

4.1.4. Pesticidas estudiados

Todos los pesticidas fueron preparados a la misma concentración molar ($2,62 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$). Todas las disoluciones de pesticidas utilizadas en el desarrollo del barrido experimental fueron testadas con la lámpara ultravioleta en ON y OFF para cada uno de los medios de fotodegradación (H_2O , $\text{NaOH } 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, H_2O_2 0,05%, $\text{Fe(III) } 6 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $\text{Fe(II) } 6 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$). Se consideró como respuesta analítica el valor medio de la intensidad de quimioluminiscencia (número de cuentas) de cinco picos consecutivos.

Se empleó como disolución test para chequear el estado del montaje de flujo, y antes de cada sesión de trabajo, una disolución acuosa de 50 mg L^{-1} ($2,62 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) de aldicarb, empleando $\text{NaOH } 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ como medio de fotodegradación [199]

Un registro típico obtenido para uno de los pesticidas estudiados en el barrido se muestra en la figura 47. Junto a los picos de la disolución de control de aldicarb, se muestran los registros para el pesticida endotal para cada medio de fotodegradación, sin fotoirradiación (lámpara OFF), y con fotoirradiación (lámpara ON). En el primer

caso se obtiene una línea base sin deriva con una desviación aproximada de ± 5 cuentas, mientras que al conectar la lámpara se aprecian picos claramente definidos.

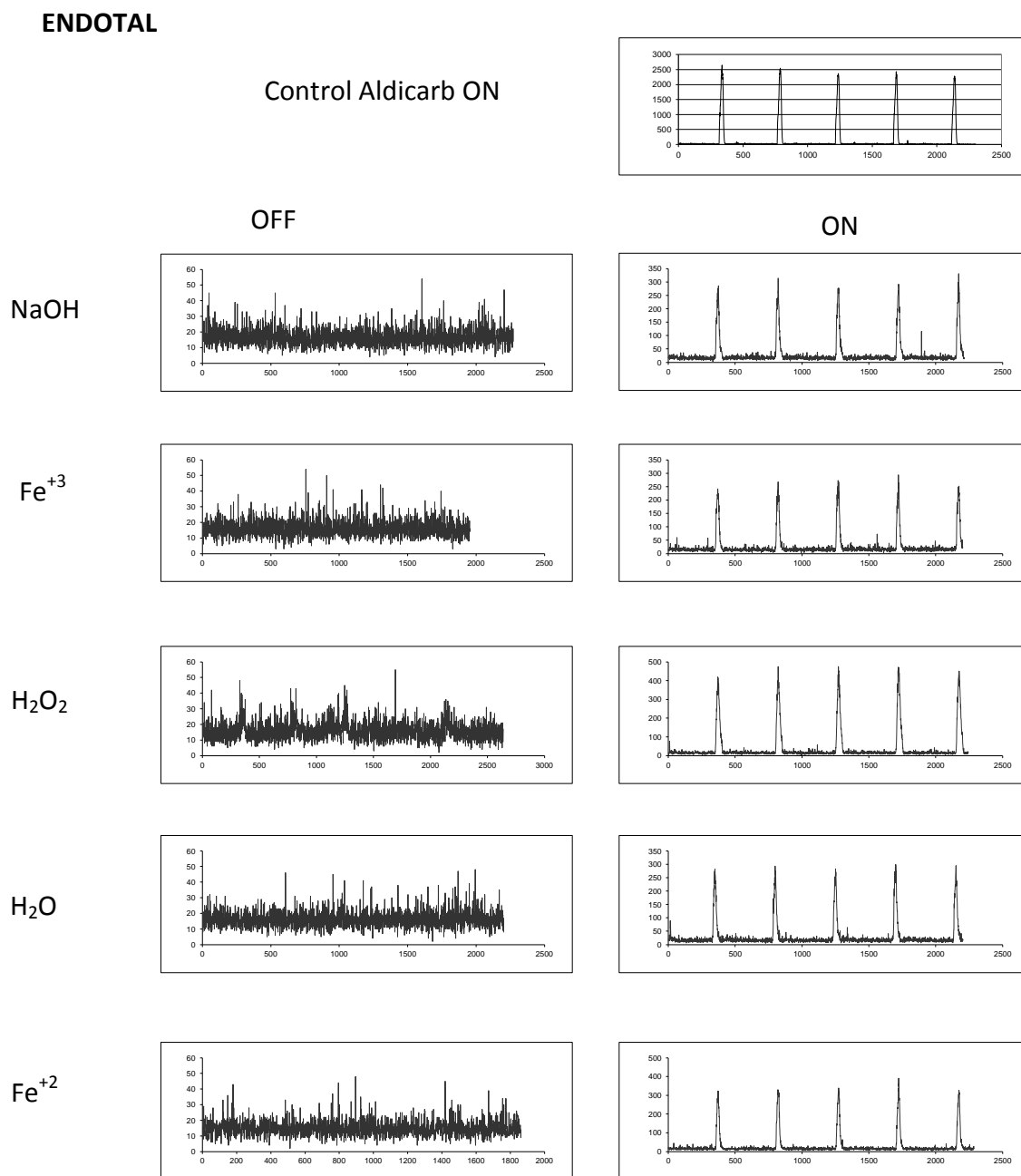


Figura 47. Registros obtenidos en el barrido para el pesticida endotal.
(Se ha representado la intensidad de emisión (en cuentas) frente al tiempo (en segundos)).

En el screening se estudiaron 163 pesticidas, con diferentes estructuras moleculares, y pertenecientes a las familias más relevantes debido a su uso extensivo y/o toxicidad (auxinas, carbamatos, imidazolinonas, organofosforados, sulfonilureas, triazinas, ureas, etc..) (tabla 11). La asignación del grupo químico, se realizó fundamentalmente empleando las bases de datos: *PAN (Pesticide Action Network pesticide database* (<http://www.pesticideinfo.org>), y *The e-Pesticide Manual* (Twelfth Edition, Version 2.2), editado por British Crop Protection Council (<http://bcpcdata.com/pesticide-manual.html>).

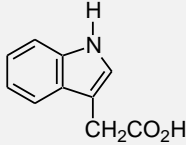
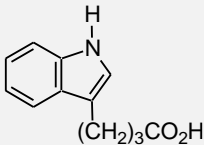
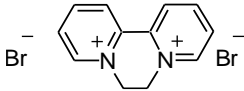
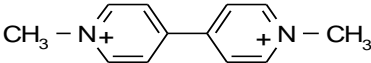
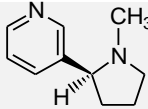
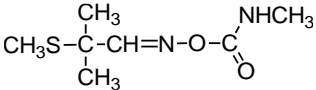
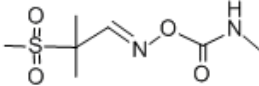
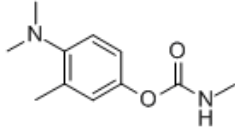
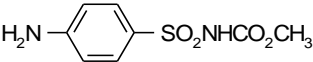
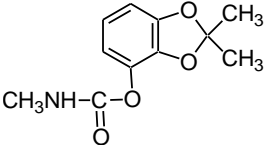
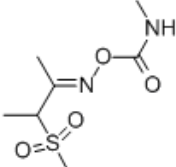
Tabla 11. Clasificación química de los pesticidas estudiados.

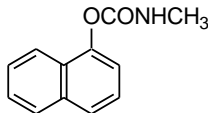
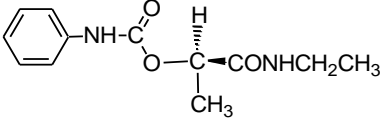
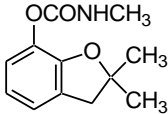
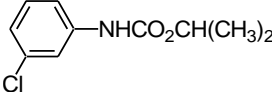
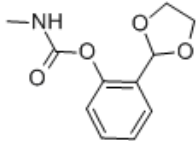
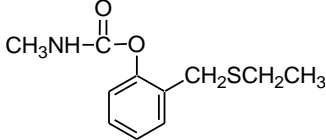
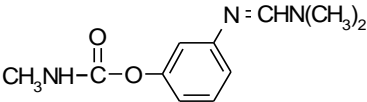
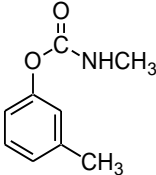
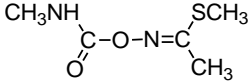
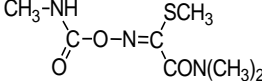
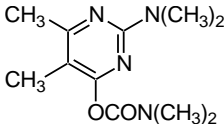
GRUPO QUÍMICO	PESTICIDA *(ACCIÓN)	ESTRUCTURA QUÍMICA
1,2,4-triazinona	METAMITRONA (H)	
	METRIBUZINA (H)	
	HEXAZINONA (H)	
1,3-Indandiona	DIFACINONA (R)	
1,3,5-triazina	AMETRINA (H)	


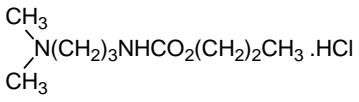
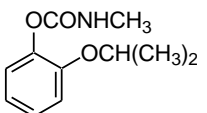
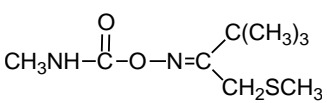
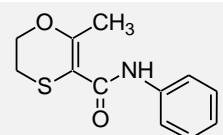
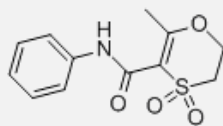
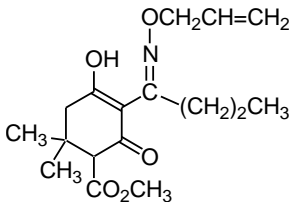
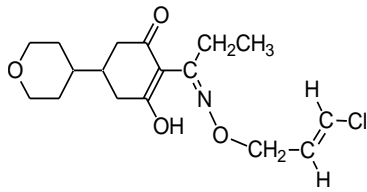
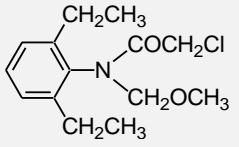
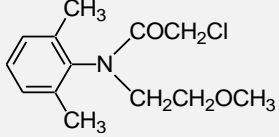
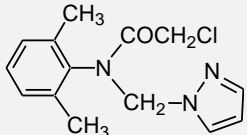
GRUPO QUÍMICO	PESTICIDA *(ACCIÓN)	ESTRUCTURA QUÍMICA
	ATRAZINA (H)	
	ATRATÓN (H)	
	CIANAZINA (H)	
	CIROMAZINA (I)	
	PROMETÓN (H)	
	SECBUMETÓN (H)	
Ácidos clorofenoxi-alcanoicos	2,4,5-T (H)	
	2,4-D (H)	
	CLOPROP (P)	

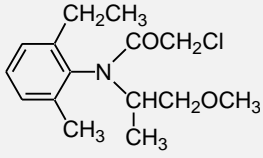
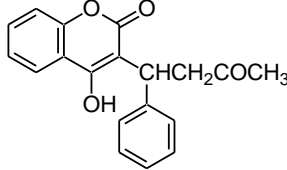
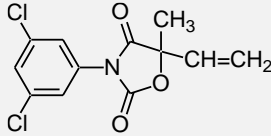
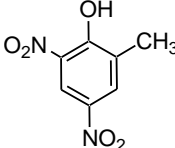
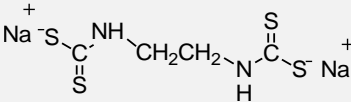
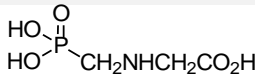
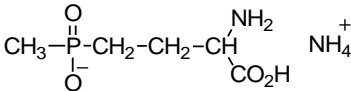
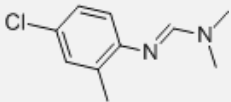
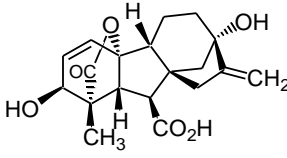
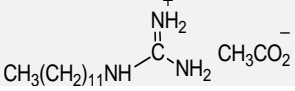
GRUPO QUÍMICO	PESTICIDA *(ACCIÓN)	ESTRUCTURA QUÍMICA
	DICLORPROP (H)	
	MCPA (H)	
	MCPB (H)	
	MECOPROP (H)	
Ácido benzoico	CLORAMBÉN (H)	
	DICAMBA (H)	
Ácido fosfónico	AMPROPILFOS (F)	
Ácido piridincarboxílico	CLOPIRALIDA (H)	
	PICLORAM (H)	
	TRICLOPIR (H)	
Aldehído	ACROLEÍNA (H)	
	METALDEHÍDO (M)	

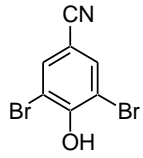
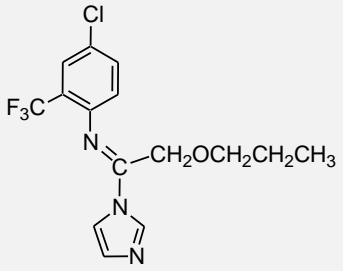
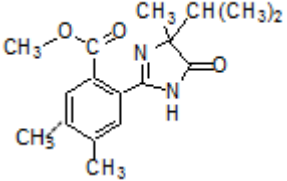
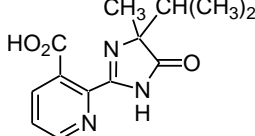
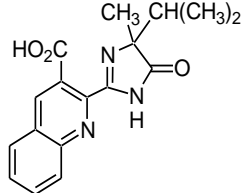
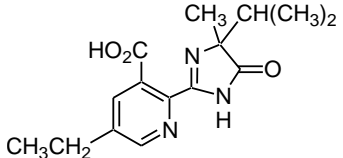
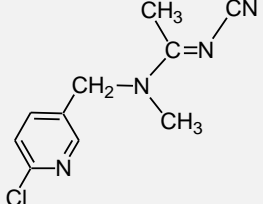
GRUPO QUÍMICO	PESTICIDA *(ACCIÓN)	ESTRUCTURA QUÍMICA
Amida	CDA (R)	
	CLORTIAMID (H)	
	DIMETENAMIDA (H)	
	ISOCARBAMIDA (H)	
Amonio cuaternario	NAPTALAM (H)	
	CLORMEQUAT CLORURO (P)	$\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3 \text{Cl}^-$
	MEPIQUAT CLORURO (P)	
Anilida	OXADIXIL (F)	
Antibiótico	ESTREPTOMICINA (B)	

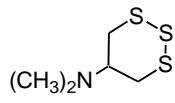
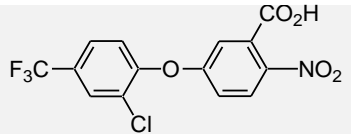
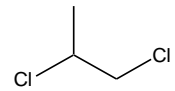
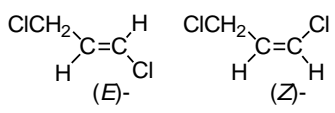
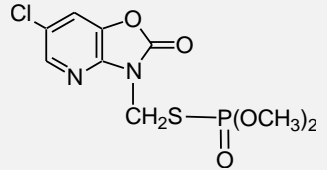
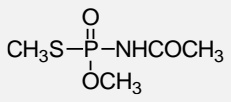
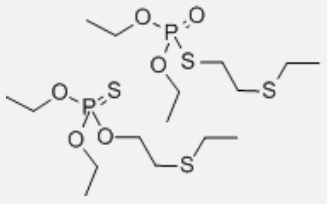
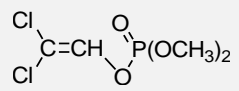
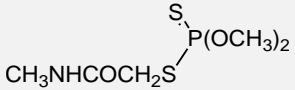
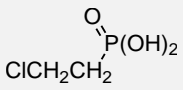
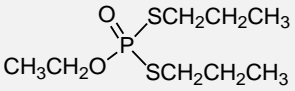
GRUPO QUÍMICO	PESTICIDA *(ACCIÓN)	ESTRUCTURA QUÍMICA
Auxinas	ÁC. 3-INDOLIL ACÉTICO (P)	
	ÁC. 4-(3-INDOLIL)-BUTÍRICO (P)	
Bipiridilos	DIQUAT DIBROMURO (H)	
	PARAQUAT DICLORURO (H)	
Botánico	NICOTINA (I)	
Carbamato	ALDICARB (I,N, Ac)	
	ALDICARB SULFONA (I,N)	
	AMINOCARB (I)	
	ASULAM (H)	
	BENDIOCARB (I)	
	BUTOXICARBOXIN (I,Ac)	

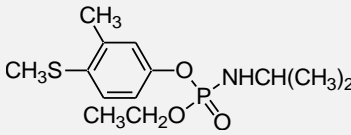
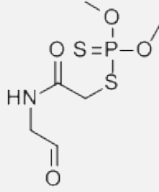
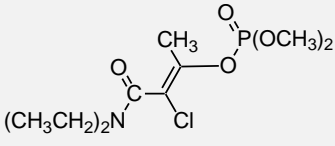
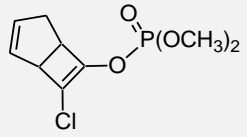
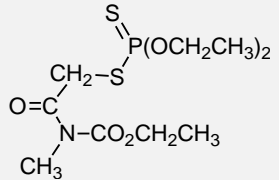
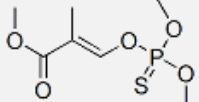
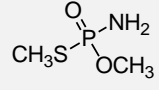
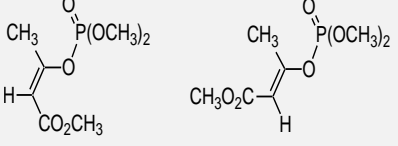
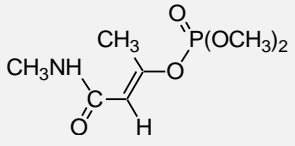
GRUPO QUÍMICO	PESTICIDA *(ACCIÓN)	ESTRUCTURA QUÍMICA
	CARBARIL (P)	
	CARBETAMIDA (H)	
	CARBOFURÁN (I,N)	
	CLOROPROFAM (H,P)	
	DIOXACARB (I)	
	ETIOFENCARB (I)	
	FORMETANATO HIDROCLORURO (I,Ac)	
	METOLCARB (I)	
	METOMILO (I,Ac)	
	OXAMILO (I,Ac,N)	
	PIRIMICARB (I)	

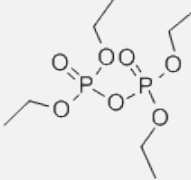
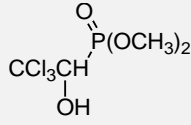
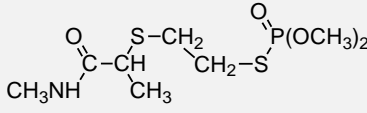
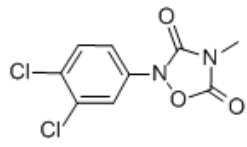
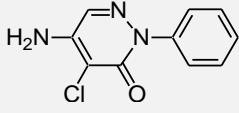
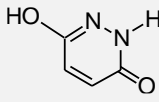
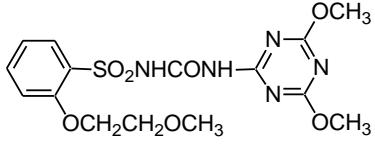
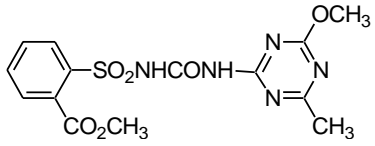
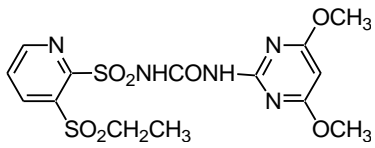
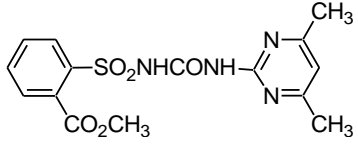
GRUPO QUÍMICO	PESTICIDA *(ACCIÓN)	ESTRUCTURA QUÍMICA
	PROFAM (H,P)	
	PROPAMOCARB (F)	
	PROPOXUR (I)	
	TIOFANOX (I,Ac)	
Carboxamida	CARBOXIN (F)	
	OXICARBOXIN (F)	
Ciclohexenona	ALOXIDIM (H)	
	TEPRALOXIDIM (H)	
Cloroacetanilida	ALACLORO (H)	
	DIMETACLORO (I)	
	METAZACLORO (H)	

GRUPO QUÍMICO	PESTICIDA *(ACCIÓN)	ESTRUCTURA QUÍMICA
	METOLACLORO (H)	
Cumarina	WARFARINA (R)	
Dicarboximida	VINCLOZOLÍN (F)	
Dinitrofenol	DNOC (I,Ac,H)	
Ditiocarbamato	METAM (F,N,H,I) NABAM (F,A)	$\text{CH}_3\text{NHCS}_2\text{H}$ 
Fosfoglicina	GLIFOSATO (N) GLUFOSINATO AMÓNICO (H)	 
Formamidina	CLORDIMEFORM (A)	
Giberelina (Fitohormona)	ÁCIDO GIBERÉLICO (P)	
Guanidina	DODINA (F)	

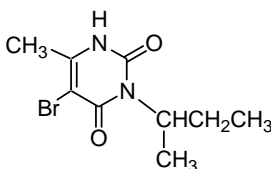
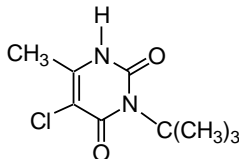
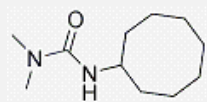
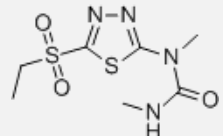
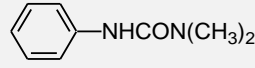
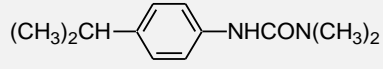
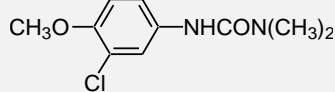
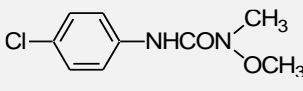
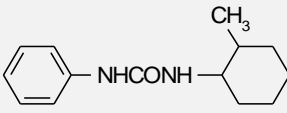
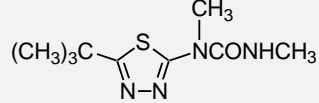
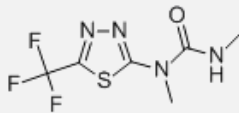
GRUPO QUÍMICO	PESTICIDA *(ACCIÓN)	ESTRUCTURA QUÍMICA
Hidroxibenzonitrilo	BROMOXINIL (H)	
Imidazol	TRIFLUMIZOL (F)	
Imidazolinona	IMAZAMETABENZ-METIL (H)	
	IMAZAPIR (H)	
	IMAZAQUÍN (H)	
	IMAZETAPIR (H)	
Neonicotinoide	ACETAMIPRID (I)	
Nereistoxina	CARTAP HIDROCLORURO (I)	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{NCOS}-\text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}-\text{N}(\text{CH}_3)_2 \\ \\ \text{H}_2\text{NCOS}-\text{CH}_2 \end{array}$


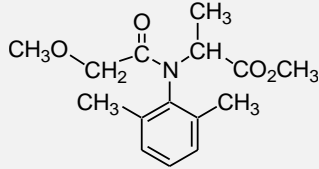
GRUPO QUÍMICO	PESTICIDA *(ACCIÓN)	ESTRUCTURA QUÍMICA
	TIOCYCLAM (I)	
Nitrofenil eter	ACIFLUORFEN (H)	
	1,2-DICLOROPROPANO (I,F)	
Organoclorado	1,3-DICLOROPROPENO (S)	
	AZAMETIFOS (I)	
	ACEFATO (I)	
Organofosforado	DEMETÓN-O (I,A)	
	DICLORVÓS (I,Ac)	
	DIMETOATO (I,Ac)	
	ETEFÓN (P)	
	ETOPROFOS (N,I)	

GRUPO QUÍMICO	PESTICIDA *(ACCIÓN)	ESTRUCTURA QUÍMICA
	FENAMIFÓS (N)	
	FORMOTIÓN (I)	
	FOSFAMIDÓN (I,Ac)	 (Z)-
	HEPTENOFOS (I)	
	MECARBAM (I,Ac)	
	METACRIFOS (I)	
	METAMIDOFOS (I,Ac)	
	MEVINFÓS (I,Ac)	 (Z)- (E)-
	MONOCROTOFOS (I,Ac)	

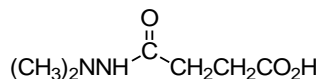
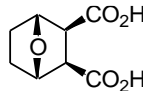
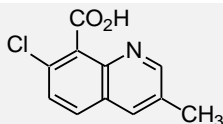
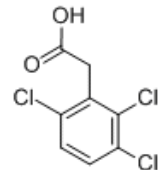
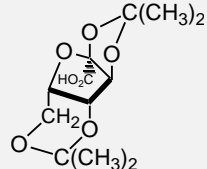
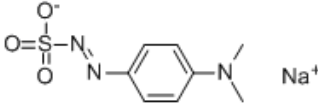
GRUPO QUÍMICO	PESTICIDA *(ACCIÓN)	ESTRUCTURA QUÍMICA
	TEPP (A)	
	TRICLORFÓN (I,Ac)	
	VAMIDOTIÓN (I,Ac)	
Oxadiozolidiona	METAZOL (H)	
Piridazinona	CLORIDAZÓN (H)	
	HIDRAZINA MALEICA (P)	
Sulfonilurea	CINOSULFURÓN (H)	
	METSULFURÓN METIL (H)	
	RIMSULFURÓN (H)	
	SULFOMETURÓN METIL (H)	

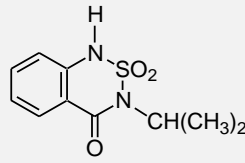
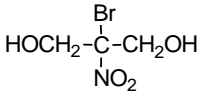
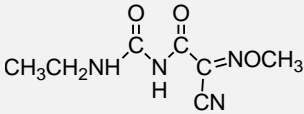
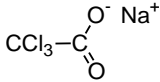
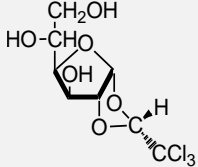
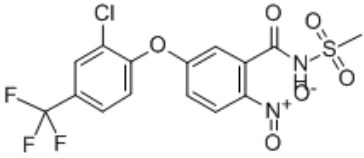
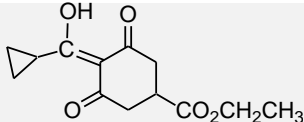
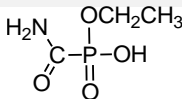
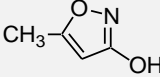
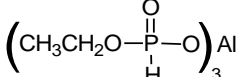
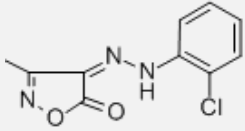
GRUPO QUÍMICO	PESTICIDA *(ACCIÓN)	ESTRUCTURA QUÍMICA
	TIFENSULFURÓN METIL (H)	
	TRIBENURÓN (H)	
Tiadiazina	DAZOMET (N,F,H,I)	
Tiocarbamato	EPTC (H)	
	MOLINATO (H)	
Tiourea	ANTU (R)	
	ETU (F)	
	AMITROL (H)	
Triazol	PROPICONAZOL (F)	

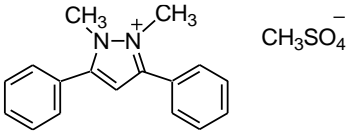
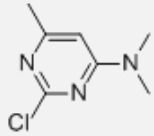
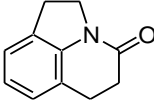
GRUPO QUÍMICO	PESTICIDA *(ACCIÓN)	ESTRUCTURA QUÍMICA
Tricloronitrometano Inorgánico	CLOROPICRINA (I,N)	Cl_3CNO_2
Uracilo	BROMACIL (H)	
	TERBACIL (H)	
Urea	CICLURÓN (H)	
	ETIDIMURÓN (H)	
	FENURÓN (H)	
	ISOPROTURÓN (H)	
	METOXURÓN (H)	
	MONOLINURÓN (H)	
	SIDURÓN (H)	
	TEBITIURÓN (H)	
TIAZAFLURÓN (H)		

GRUPO QUÍMICO	PESTICIDA *(ACCIÓN)	ESTRUCTURA QUÍMICA
Vinil cianida	ACRILONITRILO (I)	
Xililalanina	METALAXIL (F)	

OTRAS PESTICIDAS SIN CLASIFICAR

	METIL ISOTIOCIANATO (N,F,I,H)	CH_3NCS
Ácido alquilaminosuccinámico	DAMINOZIDA (P)	
Ácidos halogenados	DALAPÓN (H)	$\text{CH}_3\text{Cl}_2\text{CCOOH}$
	FLUPROPANATO (H)	$\text{F}_2\text{CHCF}_2\text{CO}_2\text{H}$
Ácido oxibiciclocoarboxílico	ENDOTAL (H,A,P)	
Ácido quinolincarboxílico	QUINMERAC (H)	
Ácido triclorofenilacético	CLORFENAC (H)	
Ácido uranosonióico	DIKELUGAC SÓDICO (P)	
Aminobenzenodiaz sulfonato	FENAMINOSULF (F)	

GRUPO QUÍMICO	PESTICIDA *(ACCIÓN)	ESTRUCTURA QUÍMICA
Benzotiadizinona	BENTAZONA (H)	
Bromopropanodiol	BRNOPOL (B)	
Cianoacetamida oxima	CIMOXANILO (F)	
Clorado	TCA (H)	
Derivado glucosa	CLORALOSA (R)	
Difenileter	FOMESAFÉN (H)	
Dioxociclohexanocarboxilato	TRINEXAPAC (P)	
Fosfonato glifosato	FOSAMINA AMONIO (H)	
Hidroxioxazol	HIMEXAZOL (F)	
Organofosfonato	FOSETIL-AL (F)	
Oxazol	DRAZOXOLÓN (F)	

GRUPO QUÍMICO	PESTICIDA *(ACCIÓN)	ESTRUCTURA QUÍMICA
Pirazol	DIFENZOQUAT METIL (H,F)	
Pirimidinamina	CRIMIDINA (R)	
Pirroquinolinona	PIROQUILÓN (F)	

*(Ac: Acaricida, A: Algicida, B: Bactericida, F: Fungicida, H: Herbicida, I: Insecticida, M: Molusquicida, N: Nematicida, P: Regulador del crecimiento de la planta, R: Rodenticida, S: Fungicida de suelo.)

4.2. Resultados de la quimioluminiscencia fotoinducida de pesticidas

Los resultados experimentales obtenidos en el screening se resumen en la tabla 12. Para cada pesticida estudiado se muestra la intensidad de emisión quimioluminiscente (en cuentas) obtenida para los diferentes medios de fotodegradación, con la lámpara UV apagada y encendida. En la última columna de la tabla se indica si existen referencias bibliográficas sobre la quimioluminiscencia de cada una de las moléculas ensayadas.

Tabla 12. Comportamiento quimioluminiscente de los pesticidas en diferentes medios.

PESTICIDA	H ₂ O (OFF/ON)	NaOH (OFF/ON)	H ₂ O ₂ (OFF/ON)	Fe(III) (OFF/ON)	Fe(II) (OFF/ON)	QUIMIOLUMINISCENCIA bibliográfica
1,2-DICLOROPROPANO	-/-	-/-	-/-	-/-	-/57	NO
1,3-DICLOROPROPENO	-/51	-/72	-/60	-/58	-/64	SI
2,4,5-T	-/236	-/403	58/327	-/296	-/328	SI
2,4-D	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	SI
ÁCIDO 3-INDOLIL ACÉTICO	5792/5986	6916/471444	6742/5761	7446/5319	7117/5415	SI
ÁCIDO 4-(3-INDOLIL)- BUTÍRICO	2036/1767	1999/38680	2323/2141	2388/1753	2285/2481	NO
ÁCIDO GIBERÉLICO	-/132	-/140	-/514	-/-	-/295	SI
ACEFATO	195/200	-/142	-/-	-/159	-/467	SI
ACETAMIPRID	-/133	-/170	-/151	-/-	-/181	SI
ACIFLUORFEN	-/79	-/105	73/350	-/82	-/-	NO
ACROLEINA	1088/17837	11151/14411	10397/14934	12336/19357	13974/16325	SI
ACRILONITRILO	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	NO

PESTICIDA	H ₂ O (OFF/ON)	NaOH (OFF/ON)	H ₂ O ₂ (OFF/ON)	Fe(III) (OFF/ON)	Fe(II) (OFF/ON)	QUIMIOLUMINISCENCIA bibliográfica
ALACLORO	-/-	-/96	-/-	-/84	-/79	SI
ALDICARB	136/7173	76/1260	-/-	-/7815	112/6768	SI
ALDICARB SULFONA	-/-	-/209	-/-	-/-	-/-	NO
ALOXIDIM	87/1728	74/646	115/1454	86/1556	97/1837	NO
AMETRINA	-/1020	-/202	-/-	-/244	-/655	SI
AMINOCARB	-/3205	2502/5213	-/1967	-/468	-/354	SI
AMITROL	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	SI
AMPROPILFOS	-/97	-/-	-/254	-/-	-/1202	NO
ANTU	482/283	311/609	507/432	135/55	-/-	SI
ASULAM	543/8209	287/13130	92/225	371/5474	834/7115	SI
ATRATÓN	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	NO
ATRAZINA	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	SI
AZAMETIFOS	-/2793	-/121952	-/2650	-/1871	897/906	NO
BENDIOCARB	80/818	-/42346	153/334	87/659	315/844	SI

PESTICIDA	H₂O (OFF/ON)	NaOH (OFF/ON)	H₂O₂ (OFF/ON)	Fe(III) (OFF/ON)	Fe(II) (OFF/ON)	QUIMILUMINISCENCIA bibliográfica
BENTAZONA	-/-	-/1003	52/1956	-/-	-/1936	NO
BROMACIL	-/54	-/125	-/149	-/58	-/91	NO
BROMOXINIL	74/1057	117/3474	108/20120	83/1029	159/2800	SI
BRONOPOL	-/-	-/-	-/201	-/-	-/-	NO
BUTOXICARBOXIM	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	NO
CARBARIL	-/127	3731/1665	-/285	-/158	-/182	SI
CARBETAMIDA	-/153	-/249	509/5336	-/204	-/270	NO
CARBOFURÁN	-/567	245/1328	197/503	-/417	66/469	SI
CARBOXIN	269/1279	181/2503	3145/1662	239/980	375/1662	NO
CARTAP HIDROCLORURO	-/110	564/942	-/77	-/100	-/96	NO
CDAА (ALIDOCLORO)	-/-	-/-	-/207	-/-	-/-	NO
CIANAZINA	-/147	-/103	-/921	-/289	-/114	NO
CICLURÓN	-/-	-/93	-/309	-/229	-/265	NO

PESTICIDA	H ₂ O (OFF/ON)	NaOH (OFF/ON)	H ₂ O ₂ (OFF/ON)	Fe(III) (OFF/ON)	Fe(II) (OFF/ON)	QUIMIOLUMINISCENCIA bibliográfica
CIMOXANILO	-/-	-/-	-/94	-/-	-/73	NO
CINOSULFURÓN	-/1765716	-/478	-/181702	-/2097102	-/107526	NO
CIROMAZINA	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	SI
CLOPIRALIDA	-/137	-/136	-/653	-/119	-/275	NO
CLOPROP	-/2163	-/2471	-/2345	-/2237	-/2714	NO
CLORALOSE	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	SI
CLORAMBÉN	26416/182605	1253/14585	1650/27708	1035/24807	1758/24393	NO
CLORDIMEFORM	-/-	-/-	63/551	-/95	-/170	NO
CLORFENAC	-/153	-/288	-/1116	-/158	-/197	NO
CLORIDAZÓN	-/103	-/161713	-/595	-/157	-/199	NO
CLORMEQUAT CLORURO	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	NO
CLOROPICRINA	-/259	-/56	-/236	-/205	-/-	NO
CLOPROFAM	-/-	-/3585	-/-	-/4493	-/4404	SI

PESTICIDA	H₂O (OFF/ON)	NaOH (OFF/ON)	H₂O₂ (OFF/ON)	Fe(III) (OFF/ON)	Fe(II) (OFF/ON)	QUIMIOLUMINISCENCIA bibliográfica
CLORTIAMID	510/809	529/1323	214/318	362/436	210/-	NO
CRIMIDINA	69/-	-/68	-/60	-/-	-/-	NO
DALAPÓN	-/112	-/95	-/202	-/70	-/88	NO
DAMINOZIDA	-/	-/-	-/158	-/-	-/-	NO
DAZOMET	748/1867	810/687	645/804	885/1175	699/1008	NO
DEMETÓN	98/949	1434/5710	-/-	99/1166	121/-	NO
DICAMBA	-/-	-/4704	628/13103	-/-	152/172	NO
DICLORPROP	-/421	-/393	-/791	-/377	-/609	SI
DICLORVOS	-/144	341/125	155/161	-/-	66/66	SI
DIFACINONA	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	NO
DIFENZOQUAT METIL	-/-	-/120	-/771	-/-	-/-	NO
DIKELUGAC SÓDICO	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	NO
DIMETACLORO	-/237	-/237	-/315	-/239	-/316	NO

PESTICIDA	H₂O (OFF/ON)	NaOH (OFF/ON)	H₂O₂ (OFF/ON)	Fe(III) (OFF/ON)	Fe(II) (OFF/ON)	QUIMIOLUMINISCENCIA bibliográfica
DIMETENAMIDA	-/2168	-/1145	-/4022	-/2500	-/3523	NO
DIMETOATO	148/323	333/376	-/-	147/347	224/378	SI
DIOXACARB	-/822	1901/3651	51/1516	-/753	-/1051	NO
DIQUAT DIBROMO	-/82	-/2194	-/-	-/-	-/-	SI
DNOC	-/-	-/-	-/155	-/-	64/92	NO
DODINA	-/-	-/-	-/115	-/80	-/-	NO
DRAZOLOXÓN	-/74	-/71	77/154(-/101	50/129	NO
ENDOTAL	-/270	-/307	-/437	-/235	-/321	NO
EPTC	-/1054	-/626	87/1022	-/1240	-/1751	NO
ESTREPTOMICINA	110/60	374/238	72/151	204/65	129/79	SI
ETEFÓN	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	NO
ETIDIMURÓN	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	NO
ETIOFENCARB	85/505	2506/557	146/574	94/541	197/797	SI

PESTICIDA	H₂O (OFF/ON)	NaOH (OFF/ON)	H₂O₂ (OFF/ON)	Fe(III) (OFF/ON)	Fe(II) (OFF/ON)	QUIMIOLUMINISCENCIA bibliográfica
ETOPROFOS	-/6296	232/11123	185/724	-/13165	139/4442	SI
ETU	406/420	354/339	205/330	331/387	357/419	NO
FENAMIFOS	-/74	318/1205	59/673	57/593	-/184	SI
FENAMINOSULF	13694/15228	12378/11525	3012/16547	2963/14260	10500/13312	NO
FENURÓN	-/373	-/1461	137/1739	-/473	94/678	NO
FLUPROPANATO	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	NO
FOMESAFÉN	-/-	-/129	66/522	-/67	-/-	NO
FORMETANATO HIDROCLORURO	91/381	25257/24357	66/304	133/358	447/1068	NO
FORMOTIÓN	241/1117	321/1296	320/1613	-/-	314/1772	NO
FOSAMINA AMONIO	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	NO
FOSETIL-AL.	-/-	-/-	123/162	-/-	131/111	NO
FOSFAMIDÓN	-/549	-/212	116/187	-/389	-/377	SI
GLIFOSATO	-/136	-/319	-/258	-/80	-/92	SI

PESTICIDA	H ₂ O (OFF/ON)	NaOH (OFF/ON)	H ₂ O ₂ (OFF/ON)	Fe(III) (OFF/ON)	Fe(II) (OFF/ON)	QUIMIOLUMINISCENCIA bibliográfica
GLUFOSINATO AMÓNICO	-/-	-/-	-/308	-/-	-/-	NO
HEPTENOFOS	215/379	255/411	204/479	217/457	221/936	NO
HEXACINONA	-/-	-/79	106/1081	-/394	163/293	NO
HIMEXAZOL	-/1171	-/598	-/851	-/954	-/673	NO
IMAZAMETABENZ METIL	-/2612	-/838	-/5681	-/2425	-/2223	NO
IMAZAPIR	-/5458	-/436	-/6126	-/4548	-/4116	NO
IMAZAQUÍN	-/1282	-/1374	203/3686	-/1196	-/1431	NO
IMAZETAPIR	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	NO
ISOCARBAMIDA	-/147	-/-	-/493	-/475	-/885	NO
ISOPROTURÓN	-/136	-/135	-/83	-/133	84/171	SI
ISOTIOCIANATO DE METILO	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	NO
MALEIC HIDRAZINA	202/414	239/2185	246/430	250/507	335/647	SI
MCPA	-/2606	-/1485	-/2059	-/2458	-/2856	SI

PESTICIDA	H₂O (OFF/ON)	NaOH (OFF/ON)	H₂O₂ (OFF/ON)	Fe(III) (OFF/ON)	Fe(II) (OFF/ON)	QUIMIOLUMINISCENCIA bibliográfica
MCPB	66/2036	71/916	-/1662	68/1536	165/1206	SI
MECARBAM	132/257	-/166	173/397	157/339	165/840	NO
MECOPROP	-/618	-/856	-/261	-/404	-/154	NO
MEPIQUAT	-/-	-/97	-/1292	-/105	-/540	NO
METACRIFOS	3349/6398	4906/3984	4130/8114	4221/7022	-/10734	NO
METALAXIL	-/721	-/714	-/1207	-/763	-/849	NO
METALDEHÍDO	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	NO
METAM	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	NO
METAMIDOFOS	-/94	-/94	-/-	-/107	-/129	SI
METAMITRONA	-/871	116/338	55/781	-/687	-/673	NO
METAZACLOR	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	NO
METAZOL	-/399	245/263	102/438	-/-	64/569	NO
METOLACLORO	-/438	-/707	-/450	-/438	-/1403	NO

PESTICIDA	H₂O (OFF/ON)	NaOH (OFF/ON)	H₂O₂ (OFF/ON)	Fe(III) (OFF/ON)	Fe(II) (OFF/ON)	QUIMIOLUMINISCENCIA bibliográfica
METOLCARB	-/2387	3152/5877	-/3067	-/3147	-/3093	SI
METOMILO	-/296	-/-	-/-	-/529	-/572	SI
METOXURÓN	-/3721	3813/4128	3507/3604	3502/3012	3731/3855	NO
METRIBUZINA	-/-	-/-	-/238	-/148	-/164	NO
METSULFURÓN METIL	-/1446	1283/1454	-/2845	-/1743	1731/-	NO
MEVINFOS	-/-	-/218	-/290	-/90	-/-	NO
MOLINATO	-/1520	2605/3303	200/2555	146/1520	161/2923	NO
MONOCROTOFOS	-/-	-/-	-/164	-/-	-/-	SI
MONOLINURÓN	-/6174	-/3836	-/7019	-/6637	-/5515	NO
NABAM	496/767	3903/3287	495/960	475/999	534/1040	SI
NAPTALAM	-/4423	-/-	1753/7578	-/-	-/933	SI
NICOTINA	-/240	-/222	-/291	-/164	-/206	SI
OXADIXIL	-/818	-/72	-/947	-/871	-/982	NO

PESTICIDA	H ₂ O (OFF/ON)	NaOH (OFF/ON)	H ₂ O ₂ (OFF/ON)	Fe(III) (OFF/ON)	Fe(II) (OFF/ON)	QUIMIOLUMINISCENCIA bibliográfica
OXAMILO	-/1351	-/115	-/-	-/1114	-/-	SI
OXICARBOXIN	-/404	783/1907	91/561	-/468	-/197	NO
PARAQUAT DICLORURO	-/171	-/391	118/-	-/180	-/177	SI
PICLORAM	-/206	-/-	-/489	-/356	-/395	NO
PIRIMICARB	-/-	-/-	-/305	-/-	-/-	SI
PIRIQUILÓN	60/544	709/12144	592/797	793/630	1350/1110	NO
PROFAM	-/121	-/407	499/3968	-/-	78/163	SI
PROMETÓN	-/-	-/89	68/51	-/-	-/63	NO
PROPAMOCARB	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	NO
PROPICONAZOL	-/110	-/-	-/197	-/-	-/221	NO
PROPOXUR	-/3430	881/4076	1386/5163	-/2950	192/36761	SI
QUINMERAC	-/-	-/149	-/95	-/-	78/71	NO
RIMSULFURÓN	-/188	-/216	-/627	-/153	-/152	NO

PESTICIDA	H₂O (OFF/ON)	NaOH (OFF/ON)	H₂O₂ (OFF/ON)	Fe(III) (OFF/ON)	Fe(II) (OFF/ON)	QUIMIOLUMINISCENCIA bibliográfica
SECBUMETÓN	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	NO
SIDURÓN	-/69	-/103	98/700	-/81	-/145	NO
SULFOMETURÓN METIL	-/108	-/122	-/126	-/94	-/142	NO
TCA	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	NO
TEBUTIRÓN	-/608	-/-	-/189	-/195	-/245	NO
TEPP	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	NO
TEPRALOXIDIM	248/574	258/503	237/613	268/713	-/649	NO
TERBACIL	-/-	-/75	80/129	-/-	-/58	NO
TIAZAFLURÓN	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	NO
TIFENSULFURÓN-METIL	-/372	-/602	-/80	-/524	-/-	SI
TIOCYCLAM	1475/1182	1490/1302	1354/970	1301/936	1370/431	NO
TIOFANOX	-/828	-/134	-/818	-/760	-/799	NO
TRIBENURÓN	-/742	-/330	-/1070	-/1032	-/667	NO

PESTICIDA	H₂O (OFF/ON)	NaOH (OFF/ON)	H₂O₂ (OFF/ON)	Fe(III) (OFF/ON)	Fe(II) (OFF/ON)	QUIMIOLUMINISCENCIA bibliográfica
TRICLOPIR	-/158	-/395	-/206	-/188	-/239	SI
TRICLORFÓN	-/-	55/-	-/-	-/-	-/-	SI
TRIFLUMIZOL	-/-	-/-	-/140	-/-	-/76	NO
TRINEXAPAC	-/2283	-/217	-/1310	57/2154	74/1254	NO
VAMIDOTIÓN	70/899	371/1097	-/90	99/993	89/749	NO
VINCLOZOLÍN	-/-	-/-	-/96	-/-	-/-	NO
WARFARINA	-/-	-/158	-/314	-/-	-/175	SI

Tras el screening se obtuvieron los siguientes resultados globales (figura 48). La figura representa los pesticidas (en %) clasificados en 4 grandes grupos: pesticidas quimioluminiscentes con y sin fotoirradiación (■), pesticidas que no presentan QL con y sin fotoirradiación (■), pesticidas que presentan QL nativa, que desaparece al ser fotoirradiados (■); y finalmente, el grupo de pesticidas que no presentan QL nativa y al ser fotoirradiados emiten radiación quimioluminiscente (■).

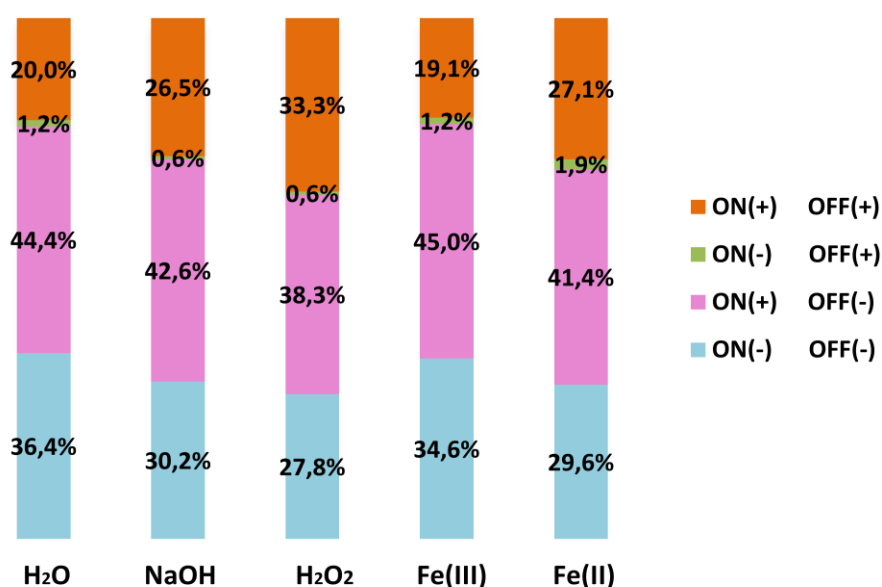


Figura 48. Comportamiento de los pesticidas en los diferentes medios de fotodegradación.

- Los porcentajes obtenidos para cada grupo fueron muy parecidos independientemente del medio de fotodegradación empleado.
- El grupo mas numeroso correspondió a los pesticidas que no presentan QL nativa, y al ser irradiado con luz UV, emiten radiación quimioluminiscente tras reaccionar con la disolución de oxidante. Estos porcentajes oscilaron entre 38% (H₂O₂) y un 45% (Fe(III)).

- Tan solo aproximadamente el 1% de los pesticidas presentaron señal quimioluminiscente nativa en algunos de los medios ensayados, y tras la fotodegradación ésta desapareció. Es el caso de la estreptomina (H_2O), el bendiocarb ($NaOH$), el paraquat dicloruro (H_2O_2), el formotión y la estreptomina ($Fe(III)$), y clortiamid, dermetón y metsulfurón metil ($Fe(II)$).

- Entre un 19% ($Fe(III)$) y un 33% (H_2O_2) de los pesticidas presentaron QL nativa con la lámpara en OFF y en ON. El 11% (18 pesticidas de los 163 estudiados) mostraron señal quimioluminiscente en todos los medios, tanto con la lámpara apagada (OFF) como encendida (ON), ácido-(3-indolil)-acético, ácido-4-(3-indolil)-butírico, acroleína, aloxidim, asulam, bromoxinil, carboxín, clorambén, dazomet, estreptomina, etilentiourea, etiofencarb, fenaminosulf, formetanato hidrocloreuro, hidrazina maleica, metoxurón, nabam, tiocyclam. En solo 3 pesticidas de este grupo (estreptomina, etilentiourea, tiocyclam), la fotodegradación no hizo que se produjera exaltación de la señal con respecto a la señal con la lámpara apagada.

- Aproximadamente un tercio de los pesticidas ensayados no presentaron un comportamiento quimioluminiscente con y sin fotoirradiación en todos los medios estudiados. Los pesticidas, que independientemente del medio resultaron no tener quimioluminiscencia nativa y tras la fotodegradación continuaron sin presentarla en todos los medios estudiados (OFF(-)/ON(-)) fueron: 1,2-dicloropropano, 2,4-D, acrilonitrilo, amitrol, atratón, atrazina, butoxicarboxim, cianazina, cloralosa, cloruro de cloromequat, difacinona, dikegulak sódico, etefón, etidimurón, flupropanato,

fosamina, imazetapir, isotiocianato de metilo, metaldehído, metam, metazaclor, propanocarb, sebumetón, TCA, TEPP, tiazafurón y ticlorfón.

Desde un punto de vista analítico el grupo más interesante resultó ser el grupo más abundante, ya que permitiría el desarrollo de nuevos métodos analíticos por QL directa para moléculas no descritas previamente como quimioluminiscentes.

Los grupos de pesticidas OFF(-)/ON(+) y OFF(+)/ON(+), fueron a su vez subdivididos en varios grupos atendiendo al incremento de la señal quimioluminiscente tras la fotoirradiación:

Grupo 1: pesticidas que aumentan su señal hasta 10 veces.

Grupo 2: pesticidas que aumentan su señal hasta 50 veces.

Grupo 3: Pesticidas que aumentan su señal más de 50 veces.

- OFF(-)/ON(+): la señal obtenida en ON se dividió por el valor medio de la línea base obtenida en el mismo proceso de medida.
- OFF(+)/ON(+): la señal obtenida en ON se divide entre la señal obtenido en OFF.

A continuación se presentan los resultados obtenidos en el screening, para cada uno de los medios de fotodegradación empleados, de acuerdo con los criterios de clasificación indicados anteriormente. En los apartados siguientes se sigue la misma estructura: en primer lugar, se mencionan los pesticidas pertenecientes al grupo **OFF(-)/ON(-)**, y a continuación, se describen los resultados obtenidos para los grupos **OFF(-)/ON(+)** y **OFF(+)/ON(+)**. Para estos últimos se muestra una gráfica con

resultados globales (porcentajes de cada uno de los subgrupos), y sendas gráficas detallando incrementos en la señal de QL de los pesticidas. Finalmente se realizan algunos comentarios sobre pesticidas concretos o grupos químicos que presentan un comportamiento singular.

4.2.1. Estudio quimioluminiscente de pesticidas utilizando como medio agua

Los pesticidas que no mostraron señal quimioluminiscente ni antes ni después de la fotodegradación (**OFF(-)/ON(-)**) en agua fueron el 36,40%: 2,4-D, acrilonitrilo, alacloro, aldicarb sulfona, amitrol, amónico, atratón, atrazina, bentazona, bronopol, butoxicarboxim, CDAA, ciclurón, cimoxanilo, ciromazina, cloralosa, clordimeform, cloromequat cloruro, clorprofam, daminozida, dicamba, difacinona, difenzoquat metil, dikegulac sódico, dodina, DONC, etefón, etidimurón, flupropanato, fosamina amonio, fosetil-Al, glufosinato, hexacinona, imazetapir, mepiquat, metaldehído, metam, metazacloro, metil isotiocianato, metribuzina, mevinfos, monocrotofos, pirimicarb, prometón, propamocarb, quinmerac, secbumetón, TCA, TEPP, terbacil, tiazafurón, triclorfón, triflumizol, vinclozólín y warfarina.

Los pesticidas pertenecientes al **grupo OFF(-)/ON(+)** fueron el 44,4% de los pesticidas estudiados. Las figuras 49 a 52 muestran su clasificación en función de la señal quimioluminiscente obtenida.

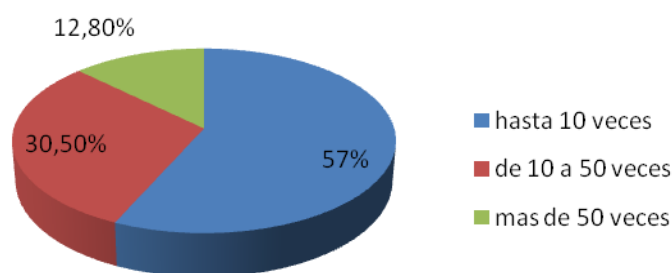


Figura 49. Proporción de pesticidas con diferente aumento de la señal quimioluminiscente para OFF(-)/ON(+) en agua.

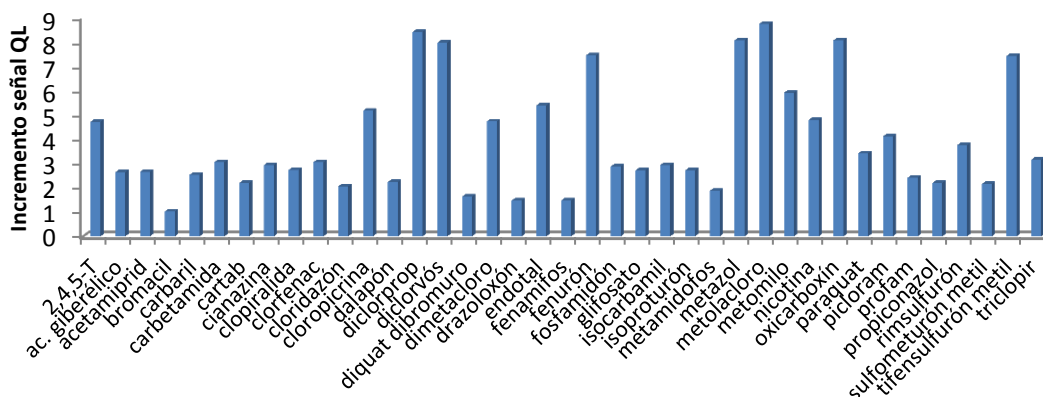


Figura 50. Pesticidas OFF(-)/ON(+) que aumentan su señal hasta 10 veces en medio agua.

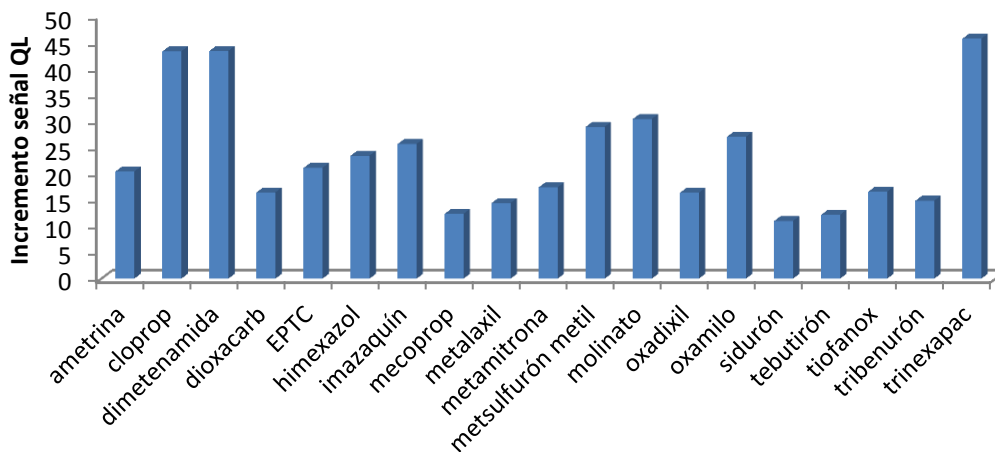


Figura 51. Pesticidas OFF(-)/ON(+) que aumentan su señal hasta 50 veces en medio agua.

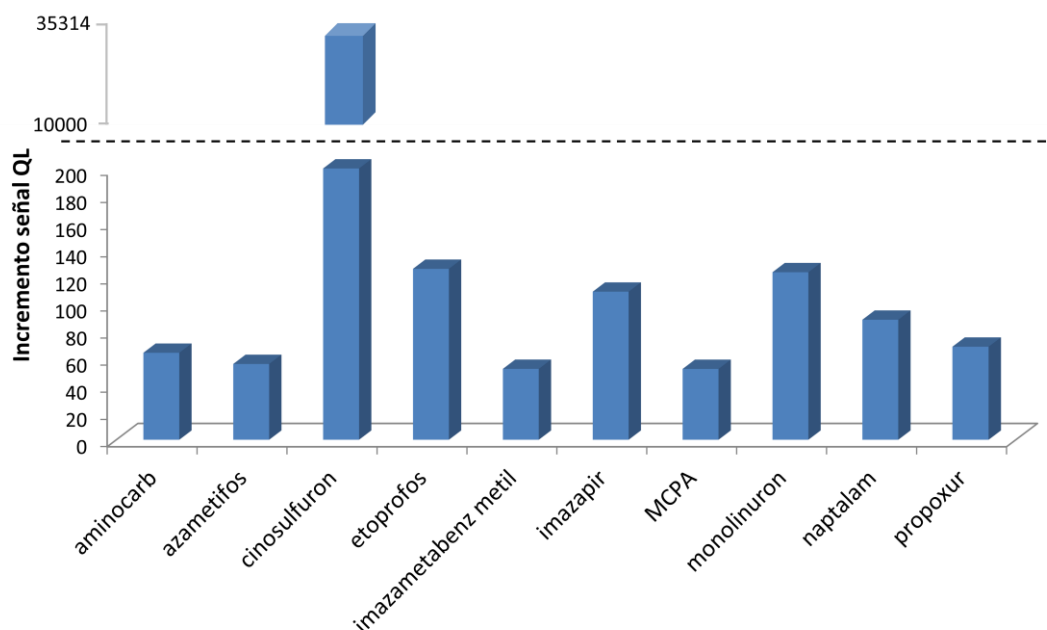


Figura 52. Pesticidas OFF(-)/ON(+) que aumentan su señal mas de 50 veces en medio agua.

El grupo de los pesticidas pertenecientes al **grupo OFF(+)/ON(+)**, son el 20% de los pesticidas estudiados. En las figuras 53 a 55 se pueden observar los porcentaje de cada subgrupo y los pesticidas correspondientes con los incrementos en la emisión QL.

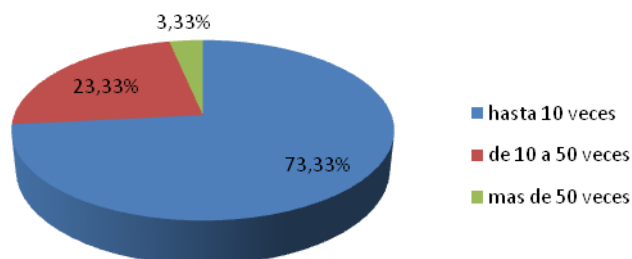


Figura 53. Proporción de pesticidas con diferente aumento de la señal quimioluminiscente para OFF(+)/ON(+) en agua.

Para este grupo de pesticidas, el acefato, clortiamid, etilentiourea, heptenofos, metoxurón y nabam, la intensidad de emisión QL permaneció inalterada al ser fotoirradiados; el clorambén disminuyó su respuesta y, solo el aldicarb aumentó su señal en más de 50 veces (52,7 veces).

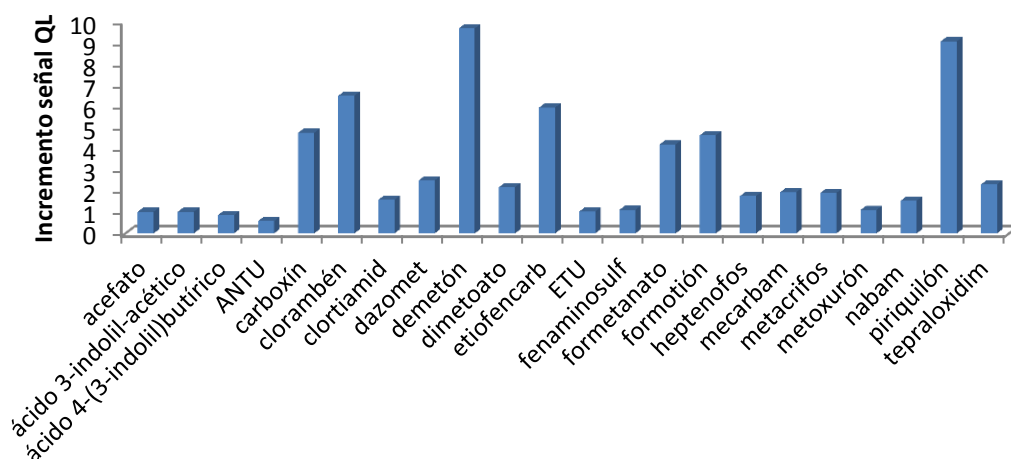


Figura 54. Pesticidas OFF(+)/ON(+) que aumentan su señal hasta 10 veces en medio agua.

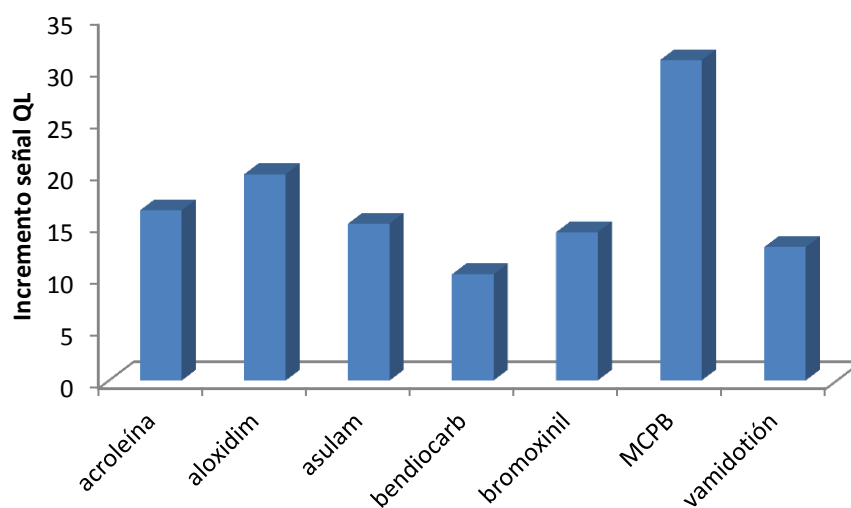


Figura 55. Pesticidas OFF(+)/ON(+) que aumentan su señal hasta 50 veces en medio agua.

● Comentarios para algunos grupos químicos más destacados.

- Los pesticidas correspondientes al grupo químico más amplio estudiado son los carbamatos (aldicarb, bendiocarb, carbaril, carbetamida, carbofurán, etiofencarb, formetanato hidrocloreuro, metomilo, metolcarb, oxamilo, pirimicarb, propanocarb,

profam, propoxur), son pesticidas que con la lámpara apagada no presentan señal o es muy débil, y después de la fotodegradación todos, excepto pirimicarb y propanocarb, aumentan la señal quimioluminiscente.

- También ocurre este comportamiento con los pesticidas del grupo químico de los tiocarbamatos (EPTC, molinato).

- En el caso del grupo químico bipyridilos los pesticidas analizados (paraquat dicloruro, diquat dibromuro) son pesticidas que con la lámpara en OFF no presentan señal, y con la lámpara en ON sí la presentan, pero es muy débil.

- El grupo químico de 1,2,4-triazinonas (metamitrón, metribuzina, hexazinona) en agua son negativos para la lámpara en ON y OFF, excepto para el metamitrón que con la lámpara en ON sí aparece señal quimioluminiscente.

- El grupo químico de las auxinas (ácido 3-indolil acético y ácido 4-(3-indolil) butírico), son quimioluminiscentes tanto con la lámpara encendida como apagada; en este grupo cuando se fotodegrada el pesticida la señal no aumenta con respecto a la lámpara apagada.

- El grupo químico de las imidazolinonas (imazapir, imazaquín, imazetapir, imazametabenz metil), son un grupo que con la lámpara apagada no tienen señal quimioluminiscente y al fotodegradarlos presentan una QL intensa, excepto para el caso del imazetapir que no presenta señal con la lámpara apagada ni encendida.

- Los pesticidas estudiados del grupo de los ácidos piridincarboxílicos (picloram, clopiralida, triclopir), son pesticidas que no presentan señal quimioluminiscente con la lámpara apagada y al fotodegradarlos son débilmente QL. Los pesticidas correspondientes al grupo químico de amonio cuaternario, no presentan quimioluminiscencia antes ni después de la fotodegradación.

4.2.2. Estudio quimioluminiscente de pesticidas utilizando como medio NaOH

Los pesticidas que no muestran señal quimioluminiscente ni antes ni después de la fotodegradación **OFF(-)/ON(-)**, son el 30,20 % de los estudiados: (1,2-dicloropropano, 2,4-D, acrilonitrilo, amitrol, atratón, atrazina, bronopol, butoxicarboxim, CDAA, cimoxanilo, ciromazina, cloralosa, clordimeform, cloromequat cloruro, daminozida, difacinona, dikegulac sódico, DNOC, dodina, etefón, etidimurón, flupropanato, fosamina amonio, fosetil-Al, glufosinato amónico, imazetapir, isocarbamida, isotiocianato de metilo, metaldehído, metam, metazacloro, metomil, metribuzina, monocrotofos, naptalam, picloram, pirimicarb, propamocarb, propiconazol, secbumetón, TCA, tebutirón, TEPP, tiazafurón, trifumizol y vinclozólín).

Los pesticidas pertenecientes al **grupo OFF(-)/ON(+)** son un 42,6 % de los pesticidas estudiados.

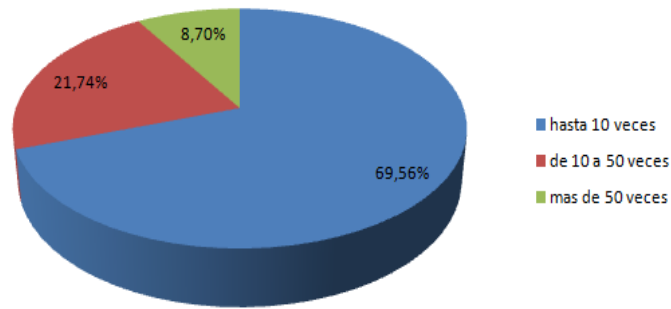


Figura 56. Proporción de pesticidas con diferente aumento de la señal quimioluminiscente para OFF(-)/ON(+) en NaOH.

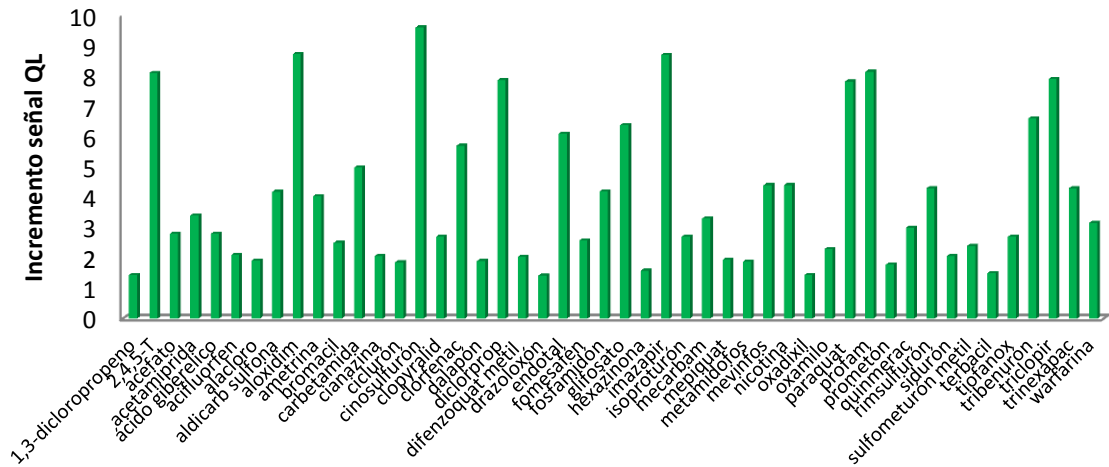


Figura 57. Pesticidas OFF(-)/ON(+) que aumentan su señal hasta 10 veces en medio NaOH.

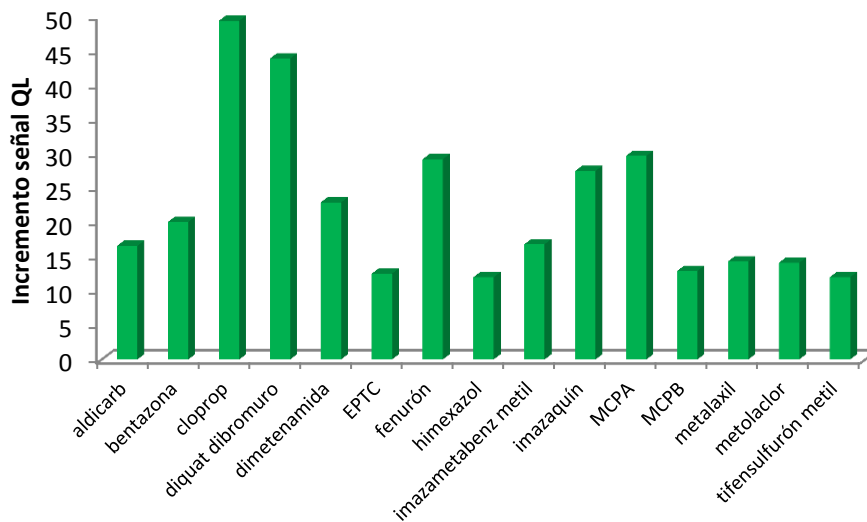


Figura 58. Pesticidas OFF(-)/ON(+) que aumentan su señal hasta 50 veces en medio NaOH.

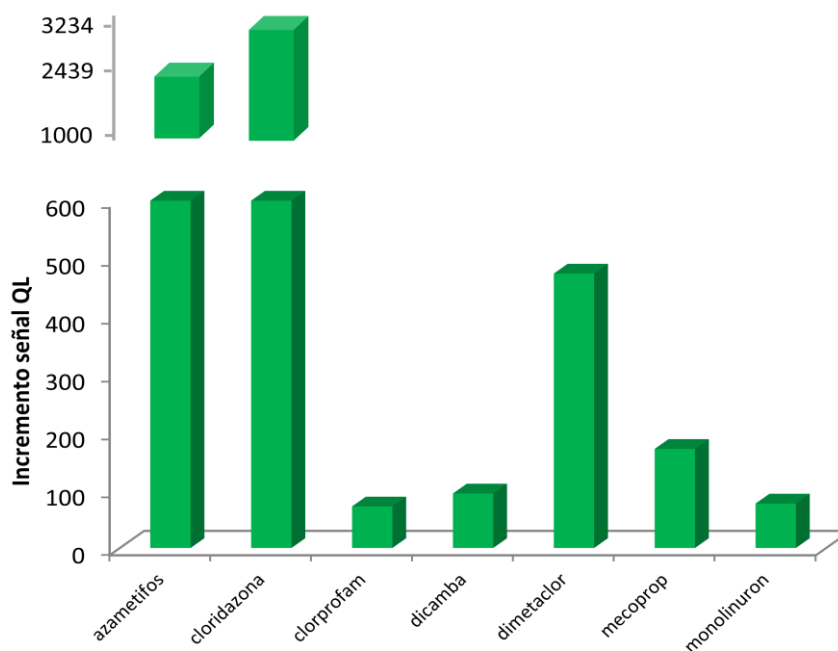


Figura 59. Pesticidas OFF(-)/ON(+) que aumentan su señal más de 50 veces en medio NaOH.

Para el grupo de pesticidas pertenecientes al **grupo OFF(+)/ON(+)**, que son el 26,5 % de los pesticidas estudiados, algunos de éstos, mantienen aproximadamente la misma señal después de fotodegradarlos: acroleína, heptenofos, metoxurón, metsulfurón metil, molinato; otros, disminuyen la señal de QL: carbaril, ETU, etiofencarb, dazomet, fenaminosulf, formetanato hidrocloreuro, metacrifos, nabam, estreptomycin y tiocyclam.

En las figuras 60 a 62 se pueden observar los porcentaje de cada subgrupo y los pesticidas correspondientes con los incrementos en la emisión QL.

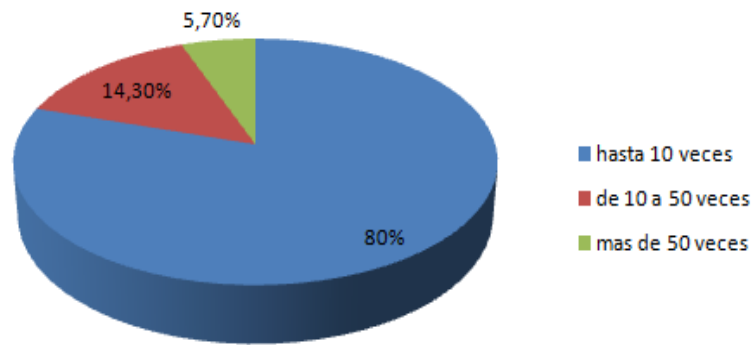


Figura 60. Proporción de pesticidas con diferente aumento de la señal quimioluminiscente para OFF(+)/ON(+) en NaOH.

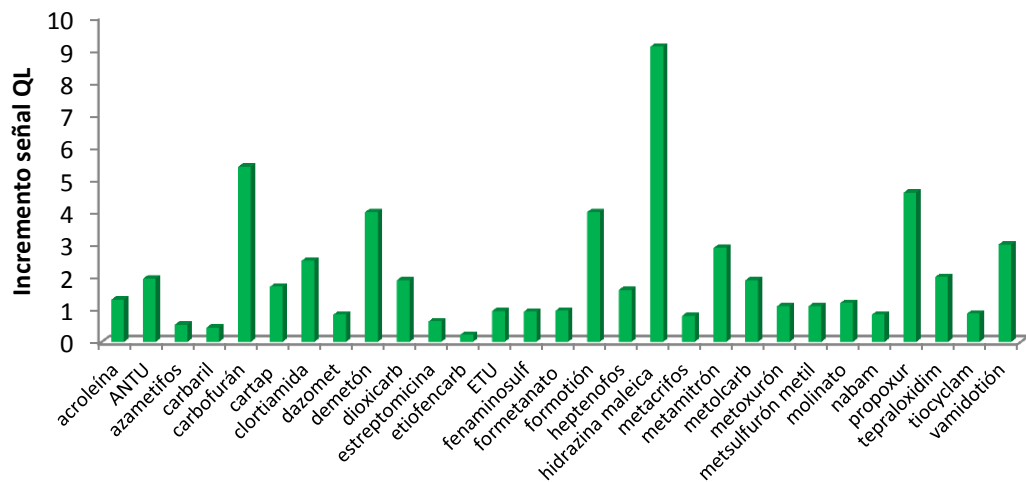


Figura 61. Pesticidas OFF(+)/ON(+) que aumentan su señal hasta 10 veces en medio NaOH.

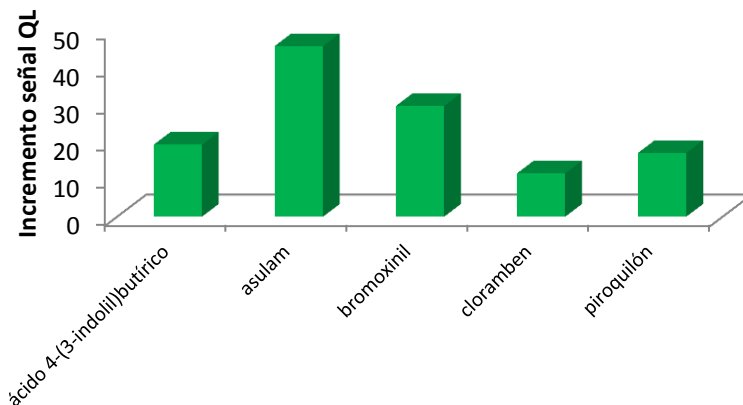


Figura 62. Pesticidas OFF(+)/ON(+) que aumentan su señal hasta 50 veces en medio NaOH.

Solo el ácido 3-indolil acético proporcionó un incremento en la emisión QL > 50 (68 veces).

● Comentarios para los grupos químicos mas destacados:

- Para los pesticidas del grupo químico de los 1,2,4-triazinas, no se observa comportamiento quimioluminiscente ni antes ni después de la fotodegradación bajo las condiciones propuestas, excepto la metamitrona, que con la lámpara apagada presenta una señal muy débil, y con la lámpara encendida aumenta ligeramente.

- El grupo de pesticidas de la familia 1,3,5-triazinas, no presenta señal quimioluminiscente con la lámpara apagada ni con la lámpara encendida.

- El grupo de los ácidos clorofenoxialcanoicos, no presentan señal con la lámpara apagada y con la lámpara encendida; la señal varía en el intervalo 400-2500, excepto para el 2,4-D, que no presenta señal.

- Los pesticidas del grupo de auxinas presentan señal tanto con la lámpara apagada como con la lámpara encendida, pero al fotodegradarlos la señal es muy intensa.

- En los carbamatos se observa un comportamiento muy desigual, si bien aldicarb, asulam, carbofuram aumentan la emisión QL al ser fotoirradiados. Mención aparte merece el bendiocarb, que no presenta QL nativa, pero proporciona una señal QL intensa con la lámpara en ON.

- Para los pesticidas de la familia de las imidazolinonas, no presentan señal con la lámpara apagada y una señal muy débil con la lámpara encendida, excepto para el imazetapir que tras la fotodegradación no se observa señal.
- Los organofosforados, un grupo muy numeroso de pesticidas estudiados, presentan un comportamiento muy dispar, pero con una escasa influencia de la fotoirradiación, salvo en el caso del etoprofos.
- El cloridazón, una piridazinona, que no es QL, se transforma en fuertemente QL por efecto de la radiación UV.
- El grupo químico de sulfonilureas, no presentan señal con la lámpara apagada excepto el metsulfurón, destacando el cinosulfurón por la intensa emisión QL con la lámpara en ON.
- El grupo químico de ureas, la respuesta que presentan es muy variada: algunos no presentan señal ni antes ni después de la fotodegradación (etidimurón y tiazafurón); o solo presentan señal tras la fotodegradación, pero muy débil, como el isoproturón y el sidurón; o tras la fotodegradación aparece una señal con cierta intensidad (monolinurón y metoxurón).

4.2.3. Estudio quimioluminiscente de pesticidas utilizando como medio H₂O₂

Los pesticidas que no muestran señal quimioluminiscente ni antes ni después de la fotodegradación **OFF(-)/ON(-)**, son el 27,80% de los pesticidas estudiados: atratón, atrazina, 1,2-dicloropropano, 2,4-D, acefato, acrilonitrilo, alacloro, aldicarb, ametrina,

amitrol, butoxicarboxim, cloralosa, cloromequat cloruro, ciromazina, demetón, dikegulac sódico, dimetoato, difacinona, diquat dibromuro, etefón, etidimurón, flupropanato, fosamina amonio, imzetapir, isotiocianato de metilo, metaldehído, metazacloro, metam, metamidofos, metomilo, oxamilo, propamocarb, secbumetón, TCA, TEPP, tiazafurón y triclorfón.

Los pesticidas pertenecientes al **grupo OFF(-)/ON(+)**, son el 38,30% de los pesticidas estudiados. En las figuras 63 a 66, se representan los resultados obtenidos para este grupo.

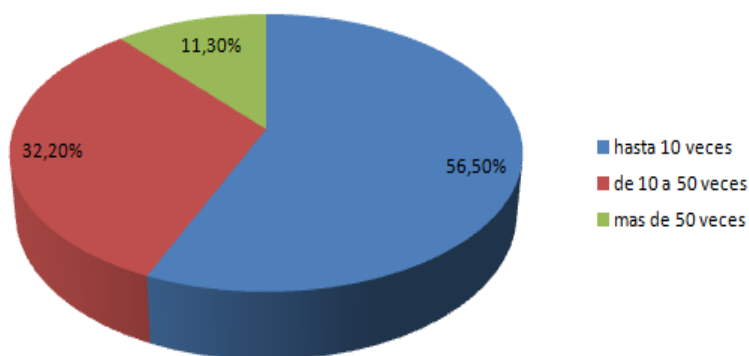


Figura 63. Proporción de pesticidas con diferente aumento de la señal quimioluminiscente para OFF(-)/ON(+) en H₂O₂.

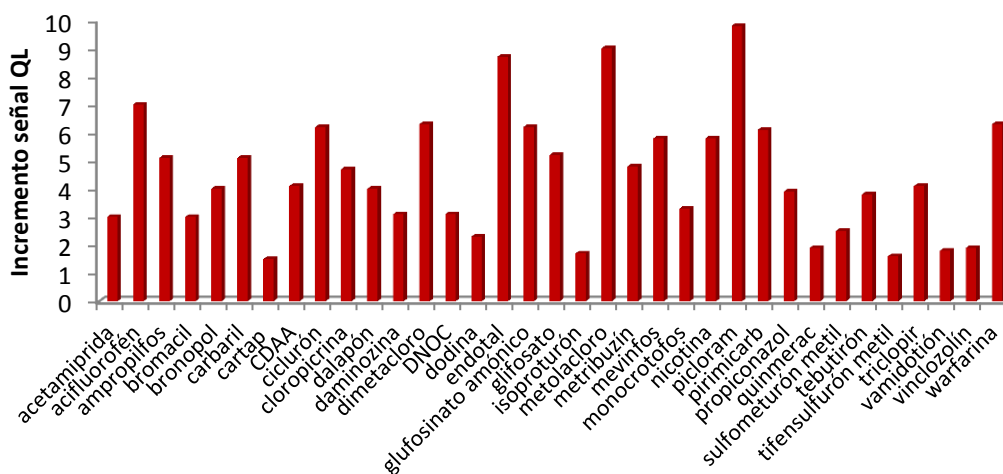


Figura 64. Pesticidas OFF(-)/ON(+) que aumentan su señal hasta 10 veces en medio H₂O₂.

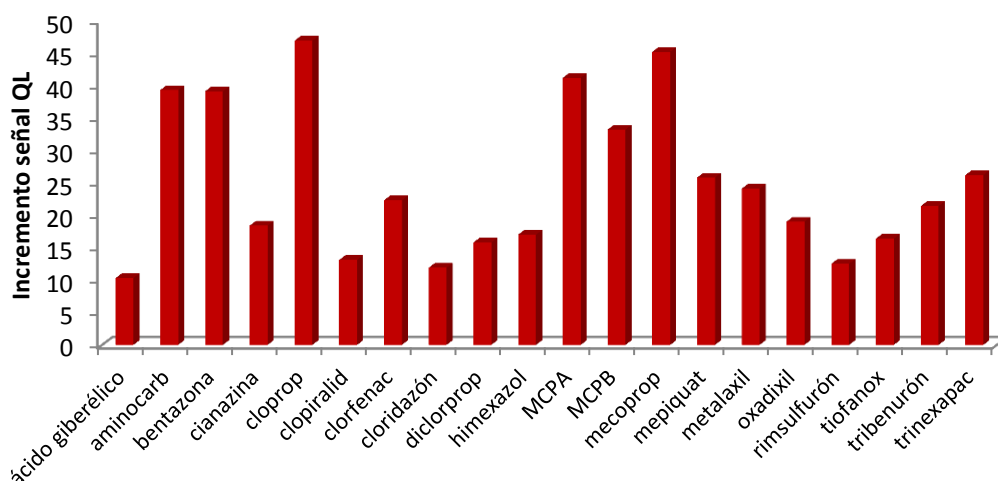


Figura 65. Pesticidas OFF(-)/ON(+) que aumentan su señal hasta 50 veces en medio H₂O₂.

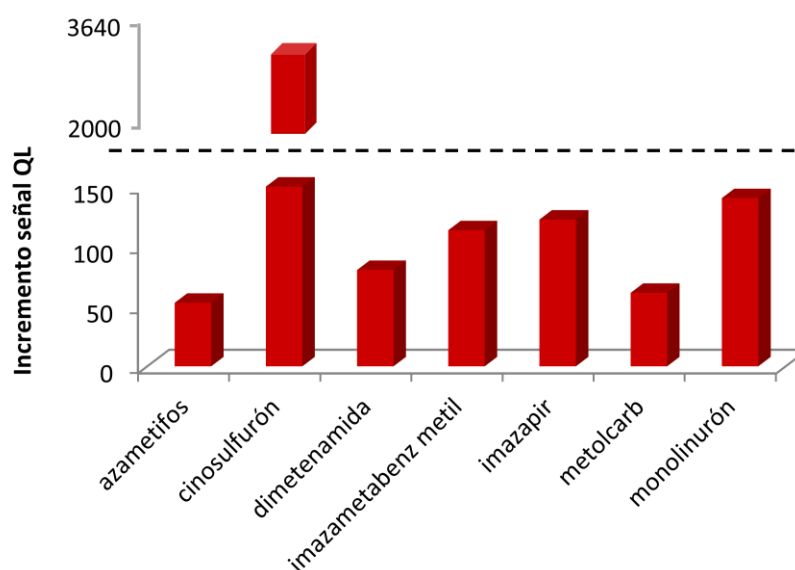


Figura 66. Pesticidas OFF(-)/ON(+) que aumentan su señal más de 50 veces en medio H₂O₂.

Como en el caso del agua, el cinosulfurón es el que da una señal quimioluminiscente más importante.

Con respecto a los pesticidas pertenecientes al **grupo OFF(+)/ON(+)**, algunos de éstos, después de fotodegradarlos, mantienen aproximadamente la misma señal:

acroleína, dazomet, diclorvos, fosetil-Al, fosfamidón, metoxurón, piroquilón, terbacil; incluso algunos que al fotodegradarlos disminuyen la señal QL, como es el caso del ácido-3-indolil acético, ácido-4-(3-indolil)butírico, ANTU, carboxim, tiocyclam.

En la figura 67 se representan las proporciones de pesticidas según su aumento de señal.

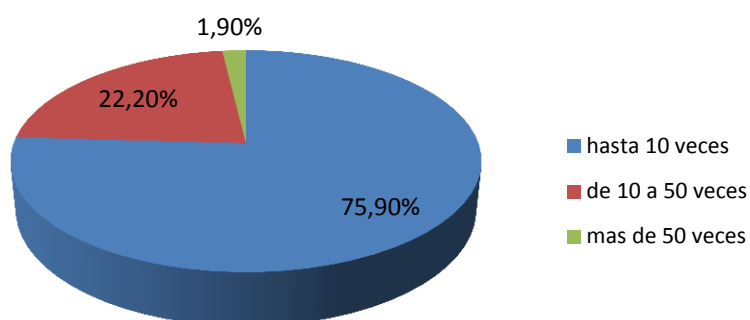


Figura 67. Proporción de pesticidas con diferente aumento de la señal quimioluminiscente para OFF(+)/ON(+) en H₂O₂.

Las figuras 68 y 69 representan los pesticidas asociados a cada uno de los subgrupos de aumento de señal QL.

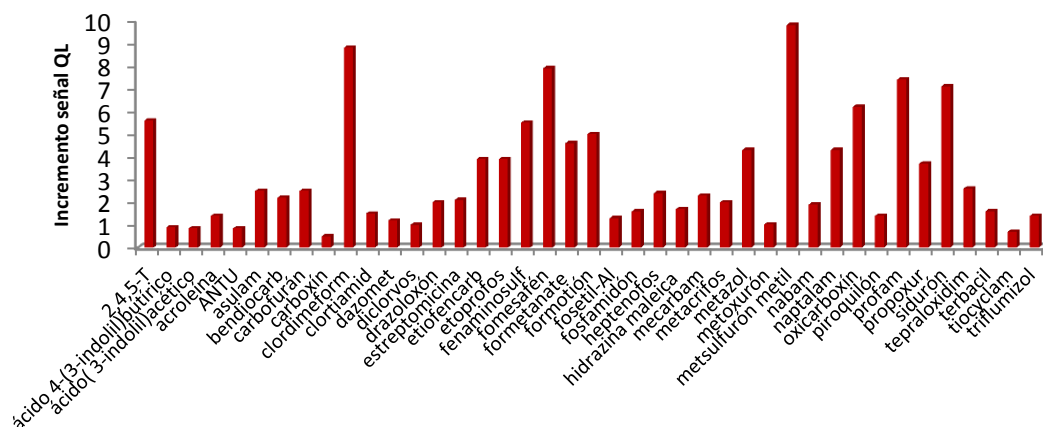


Figura 68. Pesticidas OFF(+)/ON(+) que aumentan su señal hasta 10 veces en medio H₂O₂.

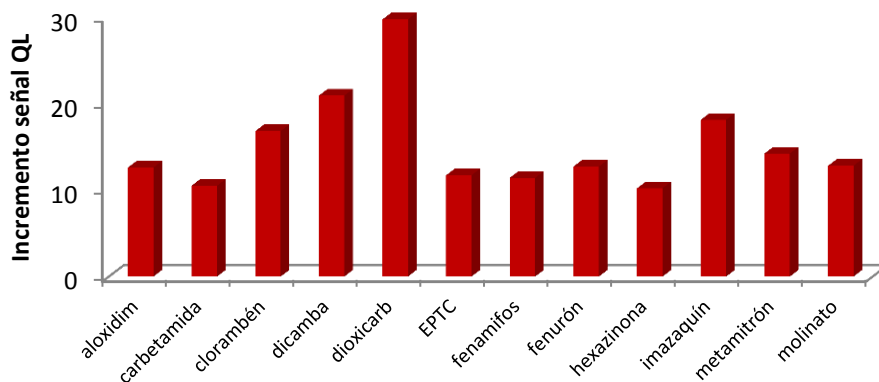


Figura 69. Pesticidas OFF(+)/ON(+) que aumentan su señal hasta 50 veces en medio H₂O₂.

El bromixinil es el único pesticida que en H₂O₂ aumenta su señal más de 50 veces, aproximadamente 186 veces.

● Comentarios para los grupos químicos mas destacados:

- Los pesticidas del grupo 1,2,4-triazinona, no presentan QL con la lámpara apagada o ésta es muy débil; tras la fotodegradación sí que se observa señal aunque no es muy destacable.

- El grupo de los ácidos clorofenoxialcanoicos solo presenta señal quimioluminiscente tras la fotodegradación, excepto el 2,4-D, para el cual no se observa señal ni antes ni tras la fotodegradación.
- El grupo de auxinas presenta una ligera disminución de la señal quimioluminiscentes después de la fotodegradación.
- Los pesticidas del grupo químico derivados del ácido benzoico sí presentan señal sin fotodegradación y tras la fotodegradación la señal es mucho más intensa.
- El grupo de los carbamatos presenta diferentes comportamientos: aquellos que presentan QL antes y tras la fotodegradación (bendiocarb, carbetamida, carbofurán, etiofencarb, profam, propoxur); los que no presentan señal ni antes ni tras la fotodegradación (aldicarb, metomilo, oxamilo, propamocarb); y, los que solo presentan señal tras la fotodegradación (carbamil, formetanato, metolcarb, pirimicarb).
- El grupo de imidazolinonas no presenta señal quimioluminiscente con la lámpara apagada, excepto el imazaquín, cuya señal es muy débil; con la lámpara encendida las señales son intensas excepto para el imazetapir que no presenta señal.
- El grupo de los organofosforados presenta un comportamiento muy dispar: pesticidas que no presentan señal ni antes ni después de la fotodegradación (dimetoato, acefato, vamidotion, metamidofos, TEPP, triclofón); pesticidas que presentan señal solo tras la fotodegradación (azametifos, ampropilfos, fenamifos, mevinfos, monocrotofos); y, pesticidas que presentan señal tanto antes como después de la fotodegradación, si

bien la emisión QL es muy débil (etoprofos, heptenofos, fosfamidón, diclorvos, metazol).

- El grupo de las sulfonilureas no presenta QL nativa, y tras la fotodegradación sí aparece señal de diferente intensidad dependiendo del pesticida, excepto para el etidimurón y el tifensulfurón metil que no presentan señal tras la fotodegradación.

4.2.4. Estudio quimioluminiscente de pesticidas utilizando como medio Fe(III)

Los pesticidas que no muestran señal quimioluminiscente ni antes ni después de la fotodegradación **OFF(-)/ON(-)**, son: 1,2-diclorpropano, 2,4-D, acetamiprid, acrilonitrilo, aldicarb sulfona, amitrol, ampropilfos, atratón, atrazina, bentazona, bronopol, butoxicarboxim, CDAA, cloralosa, cloromequat cloruro, crimidina, cimoxamilo, ciromazina, daminozida, dicamba, diclorvos, difenzoquat metil, dikegulac sódico, difacinona, diquat dibromuro, DNOC, etefón, etidimurón, flupropanato, formotión, fosamina amonio, fosetil-Al, ácido giberélico, glufosinato amónico, imazetapir, metaldehído, metam, metazaclor, metazol, monocrotofos, naptalam, pirimicarb, prometón, propamocarb, profam, propiconazol, quinmerac, sebumetón, TCA, TEPP, terbacil, tiazafurón, ticlorfón, triflumizol, vinclozólín y warfarina.

Los pesticidas pertenecientes al **grupo OFF(-)/ON(+)** son el 45% de los pesticidas estudiados; en este grupo se clasifican los pesticidas según la señal obtenida, como se muestra en las figuras 70 a 73.

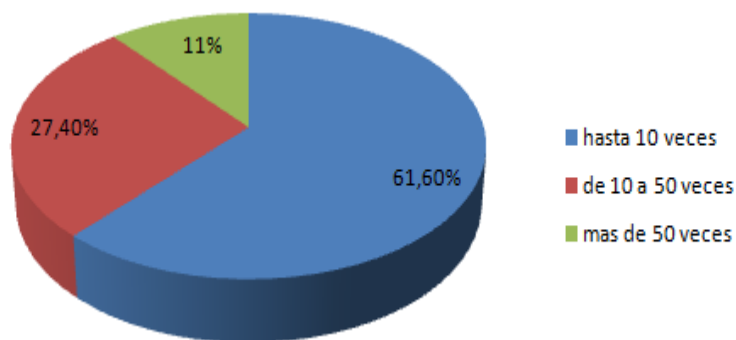


Figura 70. Proporción de pesticidas con diferente aumento de la señal quimioluminiscente para OFF(-)/ON(+) en Fe(III).

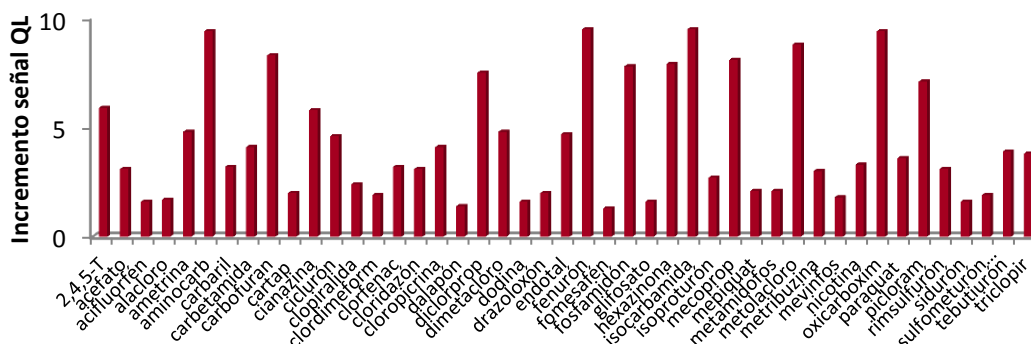


Figura 71. Pesticidas OFF(-)/ON(+) que aumentan su señal hasta 10 veces en medio Fe(III).

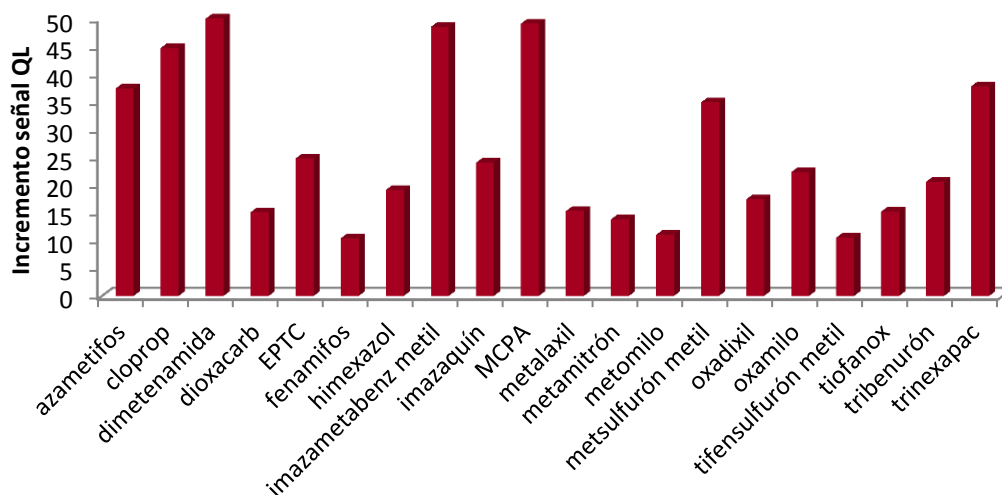


Figura 72. Pesticidas OFF(-)/ON(+) que aumentan su señal hasta 50 veces en medio Fe(III).

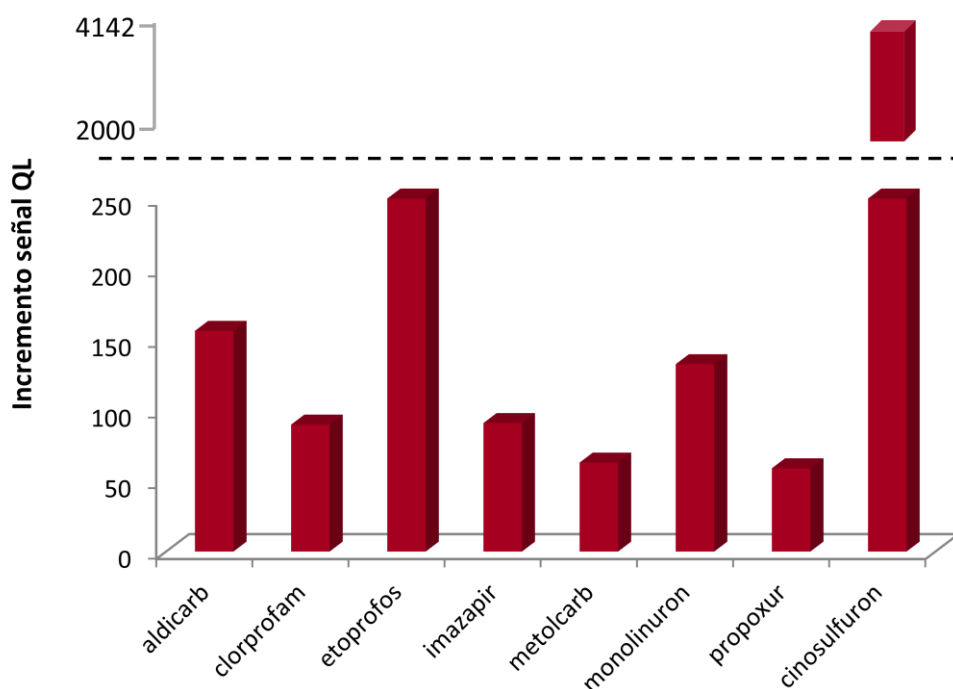


Figura 73. Pesticidas OFF(-)/ON(+) que aumentan su señal más de 50 veces en medio Fe(III).

Los pesticidas pertenecientes al **grupo OFF(+)/ON(+)** son el 19,10%; algunos de éstos, después de fotodegradarlos, mantienen aproximadamente la misma señal QL: acroleína, ANTU, clortiamida, dazomet, etilen tiourea; incluso algunos disminuyen la emisión QL al fotodegradarlos (ácido-(3-indolil)acético, ácido 4-(3-indolil)butírico, metoxurón, tiocyclam). Este es el medio que menos pesticidas tiene con este comportamiento OFF(+)/ON(+); se puede observar que este medio también es el que proporciona un menor crecimiento de la señal quimioluminiscente, ya que no existe ningún pesticida cuya señal crezca con la lámpara en ON más de 50 veces. La figura 74 muestra la proporción de pesticidas según el crecimiento de la señal.

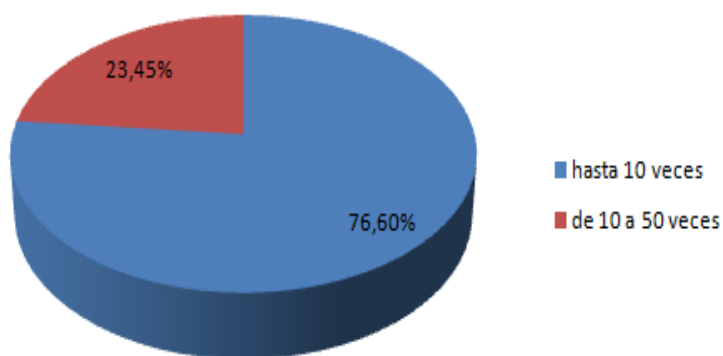


Figura 74. Proporción de pesticidas con diferente aumento de la señal quimioluminiscente para OFF(+)/ON(+) en Fe(III).

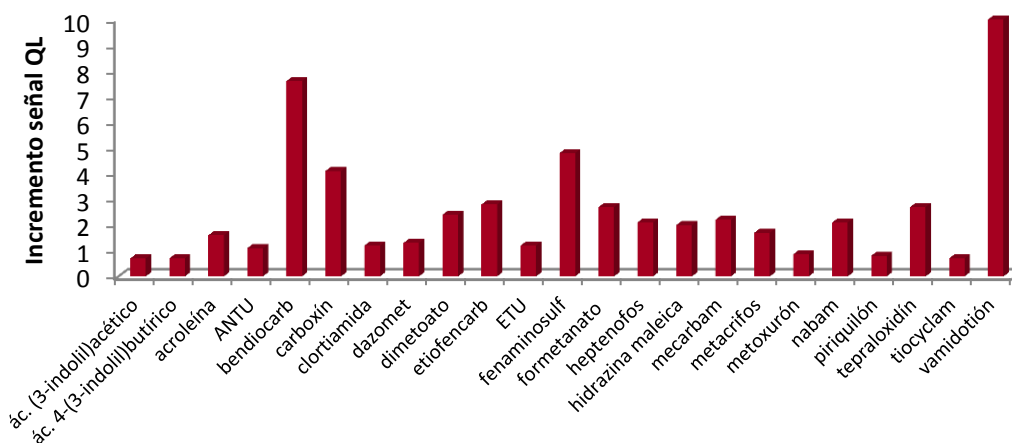


Figura 75. Pesticidas OFF(+)/ON(+) que aumentan su señal hasta 10 veces en medio Fe(III).

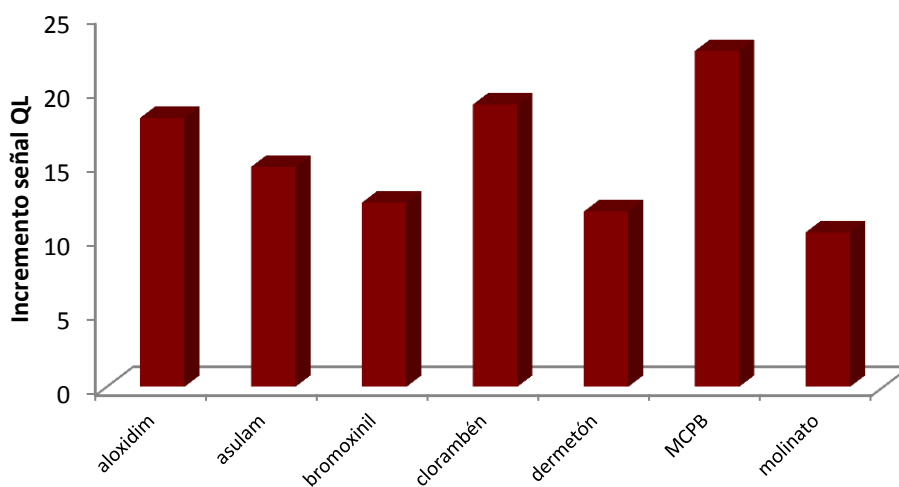


Figura 76. Pesticidas OFF(+)/ON(+) que aumentan su señal hasta 50 veces en medio Fe(III).

● Comentarios para los grupos químicos mas destacados:

- Los pesticidas del grupo químico 1,2,4-triazinone, no presentan señal quimioluminiscente antes de la fotodegradación, y sí la presentan tras la fotodegradación.
- Los pesticidas del grupo químico 1,3,5-triazina, no presentan señal quimioluminiscente ni antes ni tras la fotodegradación, o sí la presentan, es muy débil.
- El grupo de los ácidos clorofenoxialconóicos, solo presenta señal quimioluminiscente tras la fotodegradación, excepto el 2,4-D, que no presenta señal en ninguna de las dos situaciones.
- Clopiralida, picloram y triclopir, representantes del grupo de los ácidos piridincarboxílicos no presentan QL nativa; sin embargo, son débilmente quimioluminiscentes al ser fotoirradiados.
- EL grupo de las auxinas presentan señal mas intensa antes de la fotodegradación que tras la fotodegradación.
- Los pesticidas del grupo de los carbamatos presentan señal tras la fotodegradación, excepto el pirimicarb, propanocarb y profam, que tampoco presenta QL con la lámpara en ON.
- El grupo de las imidazolinonas solo presentan señal tras la fotodegradación excepto el imazetapir no presenta señal ni antes ni después de la fotodegradación.

- Los organofosforados no presentan señal quimioluminiscente antes de la fotodegradación, o es muy débil, y tras la fotodegradación aparece señal quimioluminiscente excepto para el ampropilfos, monocrotofos, TEPP, triclorfón y diclorvos.
- Las sulfonilureas solo emiten QL al ser fotoirradiadas. El cinosulfurón presenta una intensa QL fotoinducida ($> 2 \cdot 10^6$ cuentas), muy superior al resto de los medios.
- Fenaminosulf y trinexapac presentan QL con la lámpara en OFF. La intensidad de emisión QL aumenta significativamente en ambos con la lámpara en ON.

4.2.5. Estudio quimioluminiscente de pesticidas utilizando como medio Fe(II)

Los pesticidas que no muestran señal quimioluminiscente ni antes ni después de la fotodegradación **OFF(-)/ON(-)**, son: 2,4-D, acifluorfén, acrilonitrilo, amitrol, ANTU, atratón, atrazina, bronopol, butoxicarboxín, CDAA, ciromazina, cloralosa, clormequat cloruro, cloropicrina, crimidina, daminozida, dikegulac sódico, difacinona, diquat dibromuro, dodina, etefón, etidimurón, flupropanato, fomesafén, fosamina amonio, glufosinato amónico, imazetapir, isotiocianato de metilo, metalaxil, metaldehído, metam, metazacloro, mevinfos, monocrotofos, oxamilo, pirimicarb, propamocarb, secbumetón, TCA, TEPP, tifensulfurón metil, tiazafurón, triclorfón y vinclozólín.

Los pesticidas pertenecientes al **grupo OFF(-)/ON(+)** son el 41,4% de los pesticidas estudiados; en este grupo se clasifican los pesticidas según la señal obtenida, como se muestra en la figura 77.

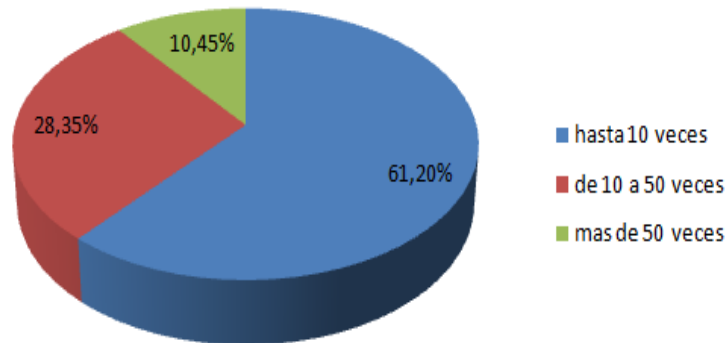


Figura 77. Proporción de pesticidas con diferente aumento de la señal quimioluminiscente para OFF(-)/ON(+) en Fe(II).

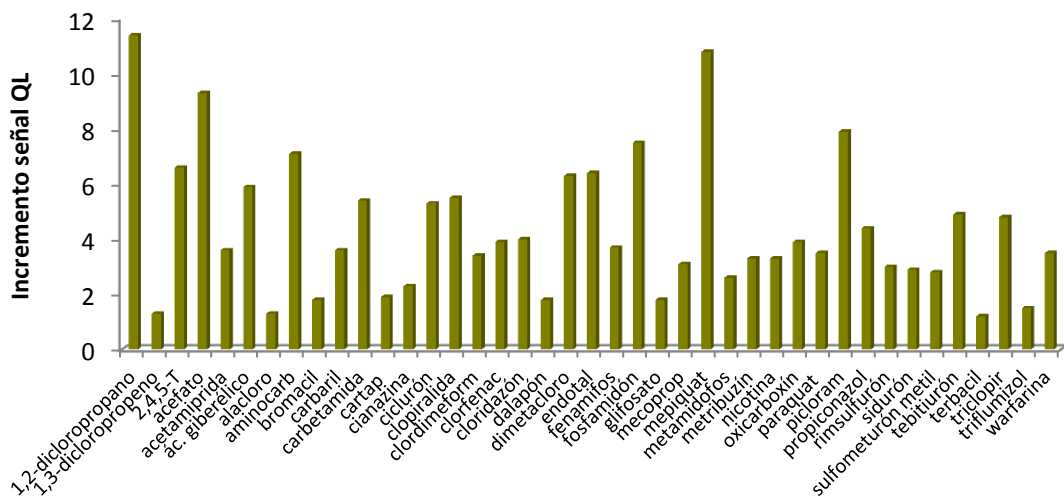


Figura 78. Pesticidas OFF(-)/ON(+) que aumentan su señal hasta 10 veces en medio Fe(II).

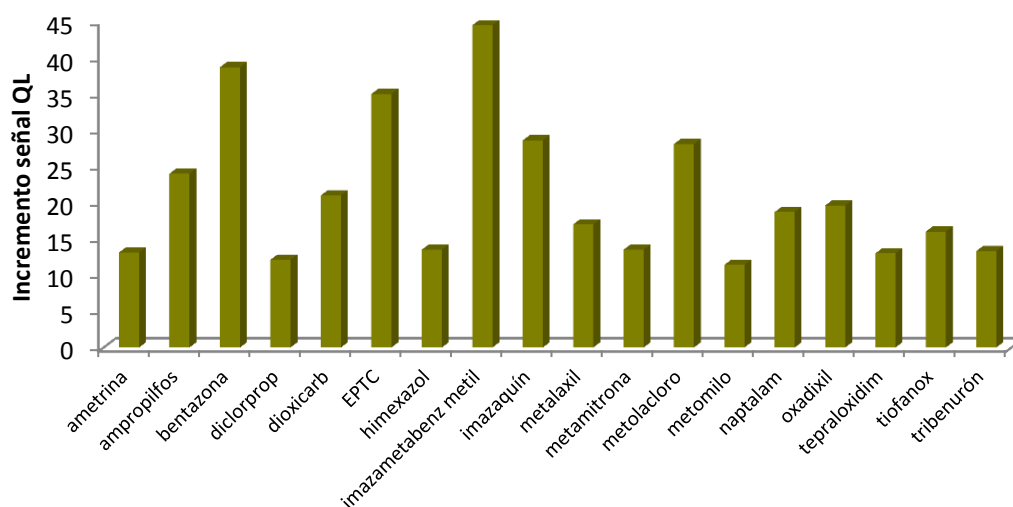


Figura 79. Pesticidas OFF(-)/ON(+) que aumentan su señal hasta 50 veces en medio Fe(II).

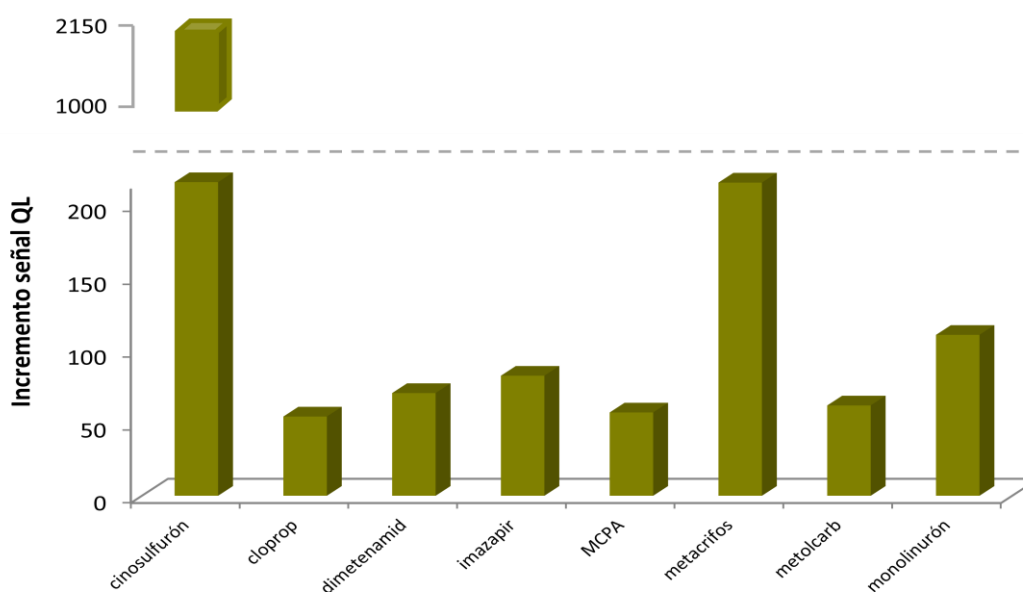


Figura 80. Pesticidas OFF(-)/ON(+) que aumentan su señal más de 50 veces en medio Fe(II).

Los pesticidas pertenecientes al **grupo OFF(+)/ON(+)** son el 27,10%; algunos de éstos, después de fotodegradarlos mantienen aproximadamente la misma señal, como son: diclorvos, DNOC, acroleína, azametifos, dazomet, dicamba, fenaminosulf, metoxurón; incluso algunos que al fotodegradarlos han disminuido la señal, como son:

ácido-(3-indolyl) acético, heptenofos, piroquilón, quinmerac, estreptomycin, tiocyclam. La figura 81 muestra la proporción de pesticidas según el crecimiento de la señal.

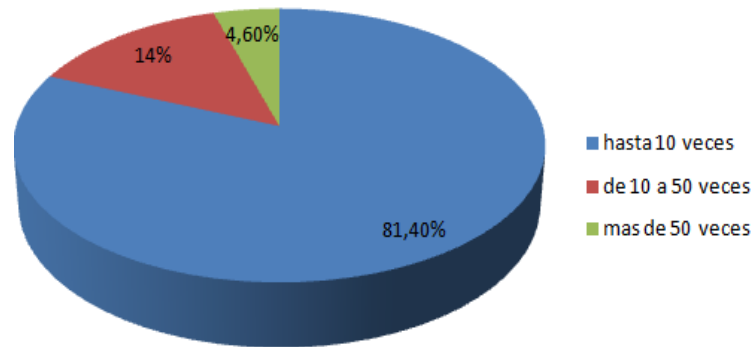


Figura 81. Proporción de pesticidas con diferente aumento de la señal quimioluminiscente para OFF(+)/ON(+) en Fe(II).

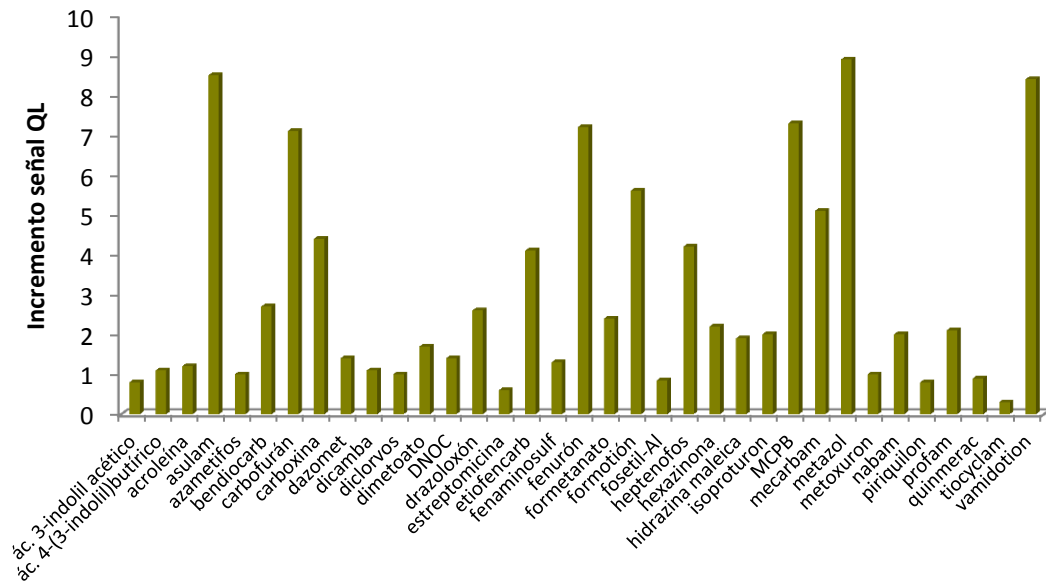


Figura 82. Pesticidas OFF(+)/ON(+) que aumentan su señal hasta 10 veces en medio Fe(II).

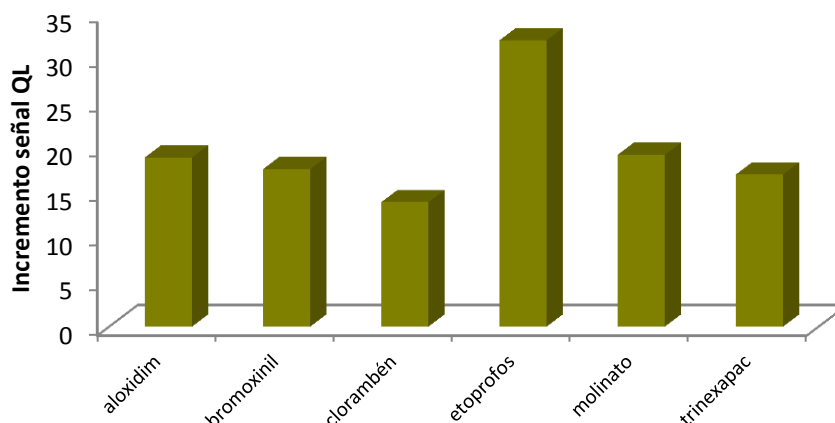


Figura 83. Pesticidas OFF(+)/ON(+) que aumentan su señal hasta 50 veces en medio Fe(II).

Los pesticidas que pertenecen a este grupo son el aldicarb, con un crecimiento de 60,4 veces su señal en OFF, y el propoxur, con un crecimiento de 191,5 veces su señal en OFF.

● Comentarios para los grupos químicos mas destacados:

- Los pesticidas del grupo de los ácidos clorofenoxialcanoicos solo presentan QL tras la fotodegradación; 2,4-D tampoco es QL con la lámpara en ON, siendo una excepción al grupo.

- Clopiralida, picloram y triclopir, representantes del grupo de los ácidos piridincarboxílicos no presentan QL en las condiciones del estudio; sin embargo, son débilmente quimioluminiscentes al ser fotoirradiados.

- Las auxinas presentan señal quimioluminiscente antes y después de la fotodegradación, si bien experimentan una disminución de la intensidad de emisión QL tras ser fotoirradiados.

- El comportamiento del grupo de los carbamatos es muy variado: butoxicarboxim, oxamilo, pirimicarb, propamocarb no presentan QL en ningún caso; aminocarb, carbaril, carbetamida, cloroprofam, dioxacarb, metolcarb, metomilo, son QL solamente al ser fotoirradiados; y, aldicarb, asulam, bendiocarb, carbofurán, etiofencarb, formetanato, profam y propoxur son QL con la lámpara encendida y apagada.
- Los tiocarbamatos EPTC y molinato muestran QL fotoinducida.
- El grupo de imidazolinonas, solo presenta señal tras la fotodegradación, excepto el imazetapir, para el cual no se observa señal ni antes ni tras la fotodegradación.
- En el grupo de los organofosforados muchos pesticidas no presentan comportamiento quimioluminiscente (etefón, mevinfos, monocrotofos, diclorvos, TEPP, triclorfón); otros exhiben únicamente QL cuando son fotodegradados (acefato, fenamifos, fosfamidón, metacrifos, metamidofos); y, dentro de los QL, azametifos, diclorvos y dimetoato apenas se ven afectados por la radiación UV, mientras que formotión, heptenofos, mecarbam, vamidotión, y especialmente etoprofos, presentan QL fotoinducida.

4.2.6. Referencias bibliográficas sobre la quimioluminiscencia de los pesticidas ensayados

Se realizó una búsqueda bibliográfica en la base de datos *Web of Science* con la finalidad de obtener información sobre el número de trabajos publicados donde se describe la quimioluminiscencia de los pesticidas ensayados. La búsqueda se llevó a

cabo utilizando como palabras clave *chemiluminescence* y el *nombre del pesticida*, sin ninguna restricción en la fecha de publicación; esto es, desde los primeros registros hasta la actualidad (10/11/14). Los resultados obtenidos se resumen en la figura 84.

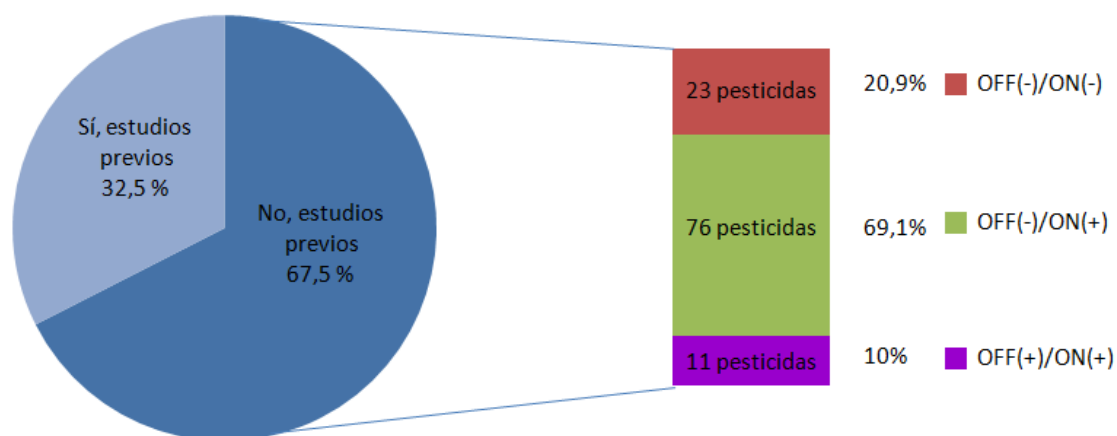


Figura 84. Búsqueda bibliográfica de estudios previos sobre la quimioluminiscencia de los pesticidas ensayados. (Fuente: Web of Science)

De los pesticidas testados el 32,5 % (53 pesticidas) aparecen referenciados como quimioluminiscentes en la bibliografía (1,3-dicloropropeno, 2,4,5-T, 2,4-D, ácido 3-indolil acético, ácido giberélico, acefato, acetamiprid, acroleína, alacloro, aldicarb, ametrina, aminocarb, amitrol, ANTU, antrazina, asulam, bendiocarb, bromoxinil, carbaril, carbofurán, ciromazina, cloralosa, clorprofam, ciromazina, diclorprop, diclorvós, diquatdibromuro, dimetoato, estreptomicina, etiofencarb, etoprofos, fenamifos, fosfamidón, glifosato, hexazinona, hidracina maleica, isoproturón, MCPA, MCPB, metamidofos, metolcarb, metomilo, monocrotofos, nabam, naptalam, nicotina, oxamilo, paraquat, primiricarb, profam, propoxur, tifensulfurón-metil, triclopir, triclofón y warfarina. Para algunos de ellos, que en el barrido no manifestaron quimioluminiscencia (OFF(-)/ON(-)) se han encontrado referencias bibliográficas en las

que se recoge su carácter quimioluminiscente si bien con sistemas o estrategias de detección QL distintas a la QL directa: amitrol, atrazina, ciromazina, monocrotopos y fosfamidón (con luminol) [399-402]; cloralosa (con lucigenina) [403]; 2,4-D y bromoxinil (con peroxioxalatos) [404-405]; aminocarb y glifosato (con tris-2,2´bipiridina rutenio (II)) [406-407]; etoprofos (con nanopartículas de Fe(3)O(4) [408]; e, inmunoensayos QL (triclopir) [409].

El grupo más numeroso (67.5%, 110 pesticidas) corresponde a los pesticidas para los cuales no se han encontrado trabajos publicados donde conste su carácter quimioluminiscente. Dentro de este grupo cabe distinguir a su vez dos grupos bien diferenciados (ver figura 84): aquellos que no presentan señal de quimioluminiscencia con y sin fotoirradiación (20,9%, 23 pesticidas), y pesticidas que proporcionan una señal positiva o negativa con la lámpara apagada, pero positiva tras fotoirradiación en alguno de los medios ensayados (70,1%, 87 pesticidas). Obviamente, este último grupo, que muestra quimioluminiscencia fotoinducida, es el más interesante desde el punto de vista analítico; en él están incluidos pesticidas quimioluminiscentes OFF(+)/ON(+) (10%, 11 pesticidas) para los cuales no existen referencias, algunos de ellos (ácido 4-(3-indolil) butítico, aloxidim, carboxim, clorambén, dazomet, ETU, fenamisosulf, formetanato, heptenofos, piroquilón y tiocyclam; y, pesticidas que no aparecen descritos en la literatura como quimioluminiscentes, y que en alguno de los medio de fotodegradación poporcionaron una señal del tipo OFF(-)/ON(+) (69,1%, 76 pesticidas), por no exhibir dicha propiedad, pero que se transforman en quimioluminiscente al ser fotoirradiados.

4.3. Conclusiones

Se presenta un sencillo y rápido método de screening para evaluar el comportamiento quimioluminiscente de una gran variedad de grupos de pesticidas, de los cuales, el 67,5 % no han sido descrito previamente como quimioluminiscentes.

La incorporación a sistemas de flujo de fotorreactores UV (lámparas de mercurio de baja presión) permite la transformación de compuestos que no presentan quimioluminiscencia nativa en compuestos quimioluminiscentes (quimioluminiscencia fotoinducida), ampliando de este modo las posibilidades de detección.

El uso de fotorreactores on-line permite también incluir una etapa eficaz de tratamiento de muestra (fotodegradación), que da lugar a una transformación y/o alteración importante de la estructura molecular de los pesticidas, modificando sus propiedades quimioluminiscentes. Una exposición de tan solo 150 segundos es suficiente para provocar cambios sustanciales en la estructura molecular.

La luz como reactivo analítico confinado en el sistema de flujo redundará en una disminución de reactivos, dando lugar a métodos analíticos consecuentes con los principios de la Química Verde (*Green Chemistry*).

El elevado porcentaje de pesticidas susceptibles de determinación mediante quimioluminiscencia fotoinducida pone de manifiesto la eficacia de esta estrategia analítica para ampliar el número de analitos detectables.

La metodología propuesta podría ser empleada como estrategia post-columna en combinación con técnicas analíticas de separación tales como HPLC.

CAPÍTULO V

CONECTIVIDAD MOLECULAR APLICADA A LA

PREDICCIÓN DE LA QUIMIOLUMINISCENCIA

FOTOINDUCIDA DE PESTICIDAS

CAPÍTULO V

CONECTIVIDAD MOLECULAR APLICADA A LA PREDICCIÓN DE LA QUIMIOLUMINISCENCIA FOTOINDUCIDA DE PESTICIDAS

5.1. Introducción

La conectividad molecular ha demostrado ser una excelente herramienta para una predicción rápida y precisa de muchas propiedades analíticas, fisicoquímicas y biológicas. La aplicación de la conectividad molecular para la predicción del comportamiento quimioluminiscente de las moléculas cuando reaccionan con oxidantes fuertes en fase líquida, y sometidas a un proceso de fotoirradiación online con radiación UV (quimioluminiscencia fotoinducida), es lo que se describe en el presente capítulo.

Para llevar a cabo este estudio se aplicó el análisis lineal discriminante por pasos (SLDA) a moléculas con comportamiento quimioluminiscente y a otras sin tal comportamiento. El SLDA permite obtener ecuaciones capaces de distinguir entre dos grupos de poblaciones; es decir, clasificar correctamente una molécula como activa o no activa, en este caso, como quimioluminiscente o no quimioluminiscente.

Para ello, se utilizó el programa informático BMDP 7M, que aplicado a dos grupos de moléculas, uno con actividad quimioluminiscente probada y otro sin actividad

quimioluminiscente reconocida, y previo cálculo de los índices topológicos de cada una de las moléculas, permite establecer una función discriminante.

Para la búsqueda y clasificación de los pesticidas se utilizaron los resultados experimentales obtenidos en el screening de pesticidas detallado en el capítulo IV de la presente memoria, empleando el montaje en flujo continuo que se describe en la figura 44 del mencionado capítulo.

Concretamente, para realizar el estudio se utilizaron 72 pesticidas que no presentaron señal quimioluminiscente en OFF y cuando son fotodegradados pueden o no presentar quimioluminiscencia.

5.2. Cálculo de descriptores e índices topológicos

En este trabajo se utilizaron varios descriptores gráfico-teóricos, como los índices de conectividad χ hasta el orden 10 (incluyendo descriptores tipo PATH, CLUSTER, PATH-CLUSTER y CHAIN [410]), los índices topológicos de carga G_i , J_i hasta orden 5 [411], índices electrotopológicos atómicos (s_i), [412-413] y otros descriptores simples, tales como el número de átomos y ramificaciones, el índice Wiener, etc. Todos estos descriptores, más de 140, se obtuvieron para cada compuesto, utilizando los programas Molconn y Desmol11. La tabla 13 muestra los índices utilizados en este trabajo, la definición y las referencias que describen su cálculo en detalle. Todos se calculan a partir de la matriz de adyacencia topológica obtenida a partir de la gráfica de hidrógeno empobrecido.

Símbolo	Nombre	Definición	Ref.
${}^k\chi_t (k=0-4 t=p,c,pc)$	Indices Randić de orden k y tipo PATH (p), CLUSTER (c) y PATH-CLUSTER (pc)	${}^k\chi_t = \sum_{j=1}^{n_t} \left(\prod_{i \in S_j} \delta_i \right)^{-1/2}$ δ_i , número de bandas, σ o n de átomos i a átomos no hidrogeno. S_j , j th subestructura de orden k y tipo t .	[410]
${}^k\chi_t^v (k=0-4 t=p,c,pc)$	Indices Kier-Hall de orden k y tipo CHAIN (p), CLUSTER (c) and PATH-CLUSTER (pc)	${}^k\chi_t^v = \sum_{j=1}^{n_t} \left(\prod_{i \in S_j} \delta_i^v \right)^{-1/2}$ δ_i^v , Kier-Hall valencia del átomo i . S_j , j th subestructura de orden k y tipo t .	[410]
${}^kD_t (k=0-4 t=p,c,pc)$	Conectividad de diferente orden k y tipo PATH (p), CLUSTER (c) Y PATH-CLUSTER (pc)	${}^kD_t = {}^k\chi_t - {}^k\chi_t^v$	[410]
$G_k (k=1-5)$	Índices topológicos de carga de orden k .	$G_k = \sum_{i=1}^{N-1} \sum_{j=i+1}^N \mathbf{M}_{ij} - \mathbf{M}_{ji} \delta(k, \mathbf{D}_{ij}) \mathbf{M} = \mathbf{A}\mathbf{Q}$ producto de adyacencia y matrices inversas del cuadrado de la distancia para el gráfico del hidrogeno molecular. \mathbf{D} , distancia matriz; δ Kronecker delta	[411]
$G_k^v (k=1-5)$	Índice topológico de carga de orden k .	$G_k^v = \sum_{i=1}^{N-1} \sum_{j=i+1}^N \mathbf{M}_{ij}^v - \mathbf{M}_{ji}^v \delta(k, \mathbf{D}_{ij})$ $\mathbf{M}^v = \mathbf{A}^v\mathbf{Q}$ Producto de electronegatividad-modificando la adyacencia y el cuadrado de la distancia de matrices inversas de hidrogeno distancia de matrices de hidrogeno molecular empobrecido. \mathbf{D} , distancia matriz; δ , Kronecker delta	[411]
$J_k, J_k^v (k=1-5)$	Índie topológico de carga ponderado de orden k .	$J_k = \frac{G_k}{N-1} \quad J_k^v = \frac{G_k^v}{N-1}$	[411]
${}^m\kappa$	Índice Kappa	${}^m\kappa = m \frac{{}^mP_{\max} {}^mP_{\min}}{({}^mP)^2}$, definido en terminos de número de vértices de gráficos A y el número de caminos mP con longitudes $m=1, 2, 3$.	[414]
S_i	Índices tipo Sum-electrotopologico.	$S_i = I_i + \Delta I_i$	[412-413]
V_i	V_3 y V_4	Número de vértices de gráfico con Valencia topológicas 3 o 4.	[415]

Tabla 13. Símbolos y definiciones de índices topológicos utilizados en este trabajo.

5.3. Análisis lineal discriminante

El análisis lineal discriminante (LDA), es una técnica útil para encontrar las funciones discriminantes. Se trata de un método de reconocimiento de patrones que permite, por variables que se combinan, la evaluación de la capacidad de distinguir entre dos o más grupos de poblaciones. En nuestro trabajo las variables independientes fueron los índices topológicos y la propiedad de la discriminación fué la quimioluminiscencia fotoinducida. El estudio SLDA se realizó con dos grupos de compuestos: el grupo de entrenamiento o *training group*, que incluye compuestos con quimioluminiscencia fotoinducida (activos), y compuestos no quimioluminiscentes incluso tras la fotoirradiación UV (inactivos), lo que facilita el descubrimiento de la función discriminante; y el grupo de prueba o *test group* (también con estructuras activas e inactivas, elegidas al azar entre el grupo de entrenamiento), lo que facilita la evaluación de la calidad de la función discriminante obtenida. La elección de funciones de conectividad se realizó con el paquete BMDP Biomedical.

Al aplicar el patrón topológico a todo el grupo, se puede construir un patrón de distribución para representar la expectativa de actividad o probabilidad de actividad para cada grupo de clasificación en cada intervalo de la función. En general, la expectativa de actividad para un grupo A, a lo largo de un intervalo de x , se define matemáticamente como:

$$E_a = \text{Porcentaje de A en } x / (\text{Porcentaje si no A en } x + 100)$$

Ea y Ei denotan la expectativa y la falta de expectativa de actividad, respectivamente, en nuestro caso.

En este trabajo, se analizó un conjunto de 72 pesticidas estructuralmente heterogéneos. Estos comprenden un grupo inactivo (pesticidas que no presentan quimioluminiscencia con lámpara OFF y ON, y un grupo activo (pesticidas quimioluminiscentes que, o bien aumentan fuertemente la respuesta quimioluminiscente con la lámpara encendida, o se convierten en quimioluminiscentes después de la irradiación). Desde el punto de vista analítico, los más interesantes son los pesticidas que presentan quimioluminiscencia tras ser fotoirradiados, ya que estos pesticidas son adecuados para el desarrollo de nuevos procedimientos analíticos sensibles y quimioluminiscentes. Cada grupo se distribuyó en dos grupos, el grupo de entrenamiento y el grupo de prueba. Sobre esta base, las funciones discriminantes obtenidas son validadas. La función discriminante (DF) elegida fue:

$$DF=1.061 S^T (\text{aCHa}) + 3.374 SS + 7.867 J^2 - 15.014^{10} \chi_p + 1.346^1 \chi^V - 9.604^4 \chi_c + 10262^6 \chi_{\text{CH}}^V - 12740$$

$$N = 72 \quad F\text{-Snedecor} = 18,37 \quad U\text{-Statistical} = 0,238$$

Donde el parámetro F es la F de Snedecor, y Wilks λ U-Statistical es el parámetro empleado en la validación de la función discriminante. Los índices de cargas Ji, $^m\chi_t$, índices de conectividad e índices electrotopológicos son utilizados como descriptores topológicos en la función discriminante y están relacionados con la distribución de carga intramolecular y características estructurales puras, respectivamente.

La bondad de la función discriminante se puede realizar por dos métodos diferentes:

- Determinar el porcentaje de acierto en la clasificación de los grupos de moléculas activas e inactivas utilizadas en el estudio, es decir, del grupo de entrenamiento activo y del grupo de entrenamiento inactivo respectivamente.
- Predicción de la clasificación de moléculas activas e inactivas no incluidas en el grupo de estudio (grupo test activo y grupo test inactivo), este procedimiento se conoce como validación cruzada.

La tabla 14 muestra la clasificación de los resultados obtenidos con el DF para cada grupo. Un pesticida se considera activo si $DF_i > 0$, o inactivo si $DF_i < 0$. En el grupo de entrenamiento se observó un porcentaje de coincidencia entre la clasificación teórica y experimental del 90 y 95,5% para el grupo de activos e inactivos respectivamente. Por otra parte, para el grupo de prueba o test, estos porcentajes fueron del 100% y 90% para los pesticidas clasificados como activos e inactivos, respectivamente.

Compuesto	D.F. ^a	Prob. ^b	Clas. ^c	Compuesto	D.F. ^a	Prob. ^b	Clas. ^c
Grupo entrenamiento – ACTIVO							
Aminocarb	5.77	0.997	+	Azametifos	2.72	0.938	+
Benzatona	7.35	0.999	+	Bromoxinil	4.01	0.982	+
Carbetamida	8.03	1.000	+	Clorprofam	5.20	0.995	+
Cinosulfuron	3.26	0.963	+	Cloprop	6.26	0.998	+
Diclorprop	4.71	0.991	+	Dioxacarb	4.60	0.990	+
Endotal	2.00	0.881	+	Etoprofos	9.28	1.000	+
2,5,4-T	3.18	0.962	+	Fenuron	8.21	1.000	+
Himexazol	-0.40	0.400	-	Imazametabenz A	4.24	0.986	+
Imazapir	2.10	0.891	+	Imazaquin	2.66	0.934	+
Isocarbamida	-4.15	0.016	-	MCPA	4.49	0.989	+
MCPB	3.33	0.965	+	Mecoprop	5.09	0.994	+
Metalaxil	6.72	0.999	+	Metamitrona	9.75	1.000	+
Metsulfuron metil	3.45	0.969	+	Monolinuron	6.15	0.998	+
Nicotina	4.67	0.991	+	Oxadixil	5.00	0.993	+
Fosfamidon	-0.82	0.306	-	Tiofanox	1.85	0.864	+
Grupo entrenamiento – INACTIVO							
Aldicarb sulfona	-5.37	0.995	-	Alidocloro	-4.15	0.984	-
Amitrol	-1.60	0.831	-	Butoxicarboxim	-3.45	0.969	-
Cloralose alfa	-7.59	0.999	-	Crimidina	-1.02	0.736	-
Ciromazina	-3.53	0.972	-	Diclorvos	-4.66	0.991	-
DNOC	-0.01	0.503	-	Etefon	-9.88	1.000	-
Etilen- tiourea	-8.92	1.000	-	Fosetil-Al	-8.42	1.000	-
Glufosinato amónico	-6.25	0.988	-	Imzetapir	-0.17	0.543	-
Monocrotofos	-3.61	0.974	-	Prometon	-3.09	0.957	-
Propamocarb	-5.52	0.996	-	Propiconazol	0.79	0.312	+
Secbumeton	-2.81	0.943	-	Terbacil	-2.44	0.920	-
Triclorfon	-7.61	1.000	-	Triflumizol	-2.72	0.938	-
Grupo test							
ACTIVO				INACTIVO			
Aldicarb	0.36	0.589	+	Bronopol	-8.24	1.000	-
Ametrina	3.66	0.975	+	Daminozida	-4.84	0.922	-
Asulam	4.00	0.982	+	Dikegulac	-3.20	1.000	-
Clorfenac	4.07	0.983	+	Ethidimuron	-0.40	0.598	-
EPTC	1.77	0.854	+	2,4-D	4.10	0.016	+
Imazametabenz B	3.79	0.978	+	Flupropanate	-8.12	1.000	-
Metazaclor	6.65	0.999	+	Metil isotiocianato	-8.10	1.000	-
Metomilo	2.46	0.921	+	Pirimicarb	-1.28	0.783	-
Propoxur	6.01	0.998	+	TCA	-8.38	1.000	-
Tribenuron	4.63	0.990	+	Tiazafluron	-4.07	0.983	-

^a Valor de DF (funcion discriminante) para cada compuesto.

^b Prob. Probabilidad de actividad.

^c Clas. Los compuestos son clasificados como activos (+) o inactivos (-) de acuerdo al valor de DF

Tabla 14. Resultados obtenidos del estudio LDA y clasificación de los compuestos de patrón de actividad quimioluminiscencia inducida propuestos.

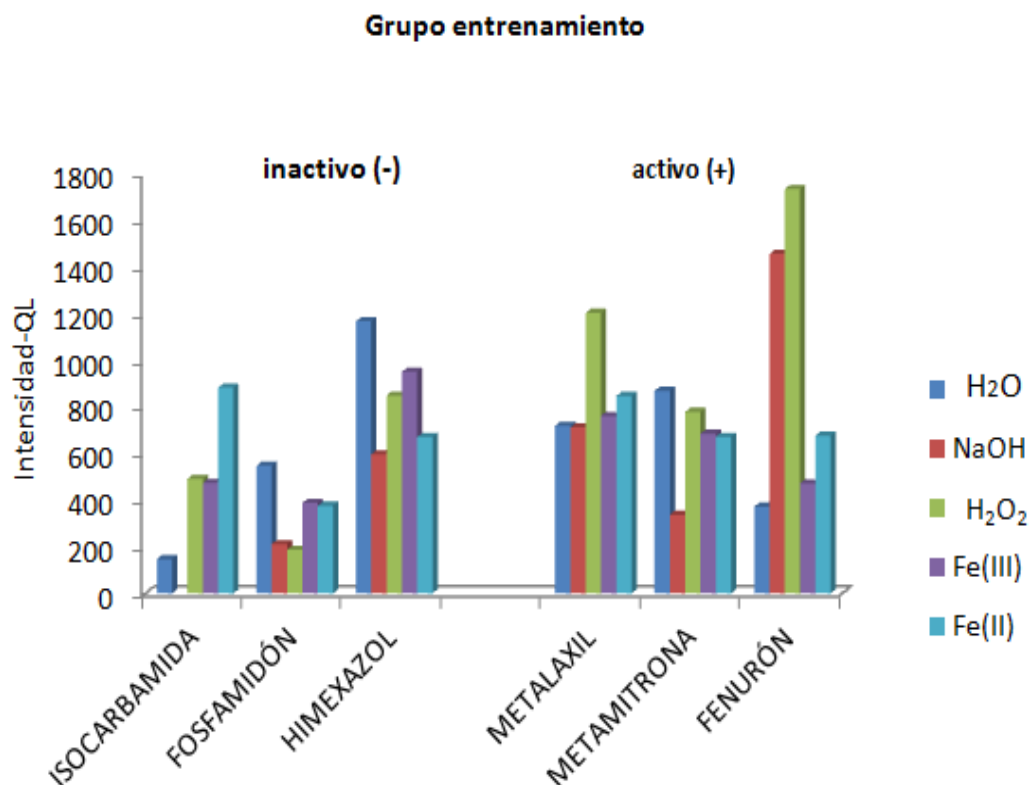


Figura 85. Pesticidas representativos del grupo entrenamiento clasificados como (+) o (-)

La figura 85, muestra las señales experimentales obtenidas para 6 pesticidas pertenecientes a distintas familias y grupos químicos: metalaxil (xililalanina), metamitrona (1,2,4-triazinona), fenurón (dimetilfenilurea), fueron clasificados correctamente dentro del grupo de los activos del grupo de entrenamiento; por el contrario, isocarbamida (amida), fosfamidon (organofosforado), y himexazol (hidroxioxazol), pertenecen al grupo de 9,4% de pesticidas del grupo de entrenamiento de los activos clasificados erróneamente.

Sin embargo, en el grupo de entrenamiento de los inactivos, solo el propiconazol (triazol), fue incorrectamente clasificado, si bién, para tan solo tres de los medios de fotodegradación ensayados (H_2O , H_2O_2 , $Fe(II)$) se obtuvieron señales de emisión QL inferiores a 200 cuentas (figura 86).

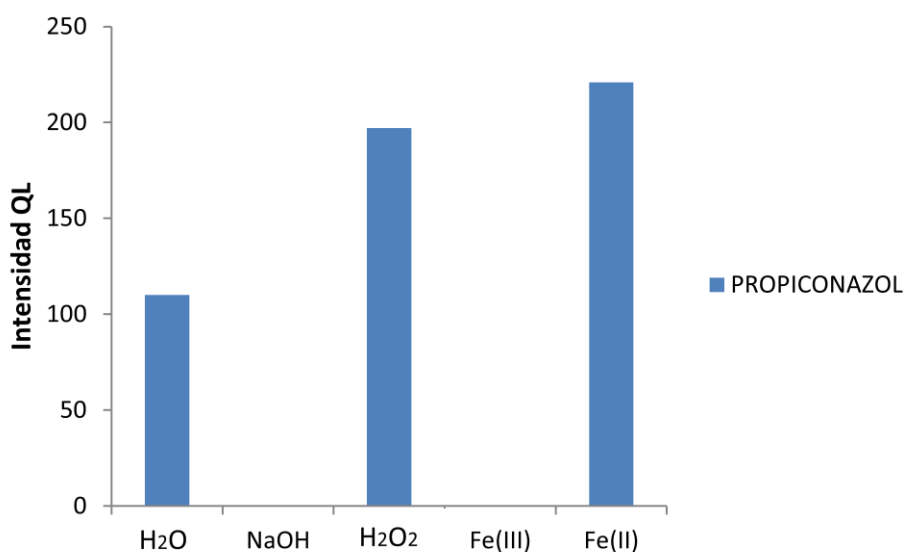


Figura 86. Pesticida del grupo de entrenamiento de inactivos clasificado como positivo.

Los diagramas de distribución pueden ser construidos representando la expectativa de actividad para cada grupo de clasificación en cualquier intervalo de la función discriminante (DF). La región de superposición de los gráficos se relaciona con la capacidad de discriminación de la función de DF. La capacidad discriminante de la función DF está asociado a un pequeño o inexistente (en el límite) región de superposición. Diagramas de distribución para la formación y grupos de ensayo se representan en la figura 87.

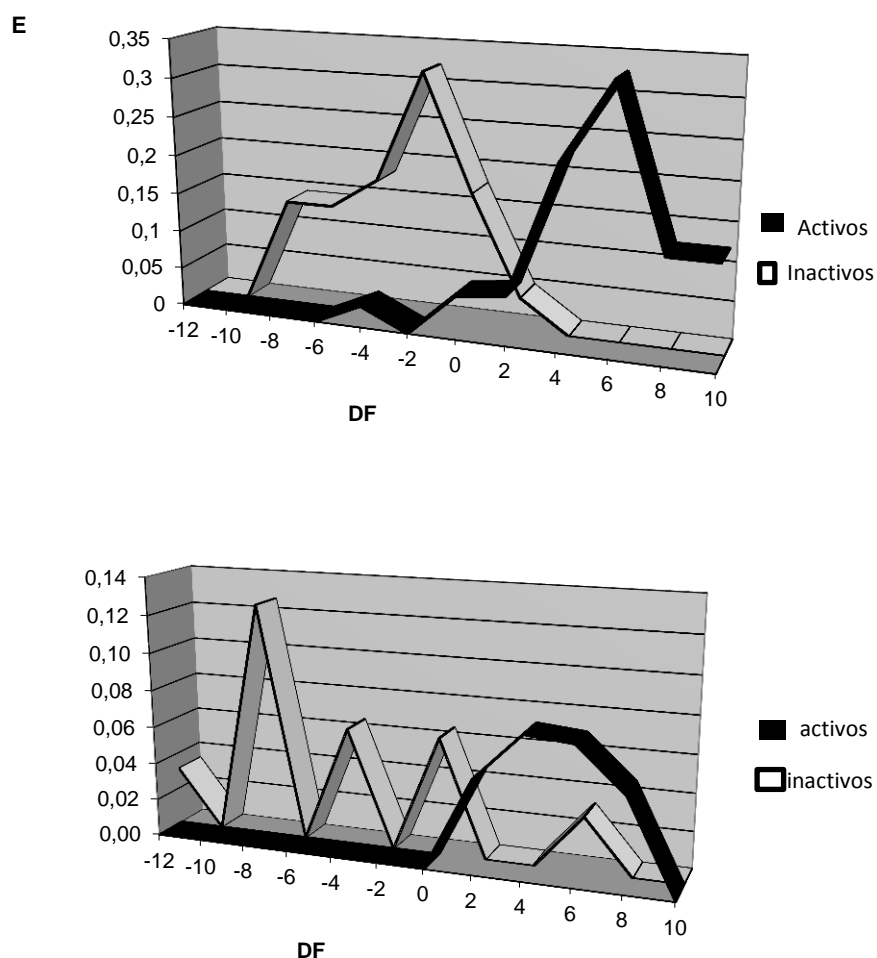


Figura 87. Diagramas de distribución de la actividad de quimioluminiscencia fotoinducida. Línea blanca: pesticidas no presentan quimioluminiscencia fotoinducida. Línea negra: pesticidas que presentan quimioluminiscencia fotoinducida. Superior: grupo de entrenamiento. Bajo: grupo de ensayo.

El poder discriminante de la DF propuesto es confirmado por la correcta clasificación de los compuestos cerrados estructuralmente relacionados. Los pesticidas de la familia de las imidazolinonas, imazapir, imazaquín (grupo de entrenamiento activo) $Df_i > 0$ y una probabilidad mayor que 0,89. Imazametabenz (en realidad una mezcla de imazametabenz A (2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-4,5-dihidro-1H-imidazol-2-il)-5-metil-benzoico) y imazametabenz B (2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-4,5-dihidro-1H-

imidazol-2-il)-4-metil-benzoico) puede ser destacados. Ambos, de ellos el (imazametabenz A y B) fueron clasificados como compuestos activos, el primero en el grupo de entrenamiento y el otro en el grupo de prueba, con una probabilidad superior a 0,97. En la familia de 1,3,5-triazina ciromazina y prometón estaban inactivos pero ametrina se incluyó correctamente en el grupo activo. En general, los pesticidas de la familia de los carbamatos presentan $D_{fi} > 0$. Este fue el caso de aldicarb, aminocarb, asulam, carbetamida, clorprofam, EPTC, metomilo, propoxur y tiofanox. Sin embargo, propamocarb, pirimicarb y butoxicarboxim eran clasificados como compuestos inactivos.

5.4. Predicción de la quimioluminiscencia fotoinducida de pesticidas por conectividad molecular

Por último, la función discriminante se aplicó a estructuras no empleadas en el desarrollo y la validación de la función DF. El criterio $DF > 0$ fue elegido para la selección de nuevos pesticidas como posibles pesticidas activos. La viabilidad de la predicción teórica de la quimioluminiscencia fotoinducida de pesticidas, se confirmó experimentalmente, mediante pruebas en el sistema de flujo por multiconmutación para los pesticidas teóricamente clasificados como activos. Se encontró una buena correlación para los compuestos ensayados (tabla 15).

Compuesto	D.F. ^a	Prob ^b	Clasificación teórica ^c	Resultado Experimental	Medio ^d
Clopiralida	1.48	0.805	+	+	Todos los medios
Ciclorón	5.43	0.995	-	+	Fe(III)/Fe(II)/H ₂ O ₂
Cimoxanilo	-2.47	0.920	-	-	H ₂ O ₂ /Fe(III) ^e
Dimetenamida	3.40	0.968	+	+	Todos los medios
Fosamina	-6.12	0.986	-	-	Todos los medios
Glifosato	-8.07	1.000	-	+	Todos los medios
Mecoprop	5.09	0.993	+	+	Todos los medios
Mepiquat	-1.28	0.783	-	+	NaOH/Fe(III)/Fe(II)/H ₂ O ₂
Metolcarb	6.25	0.998	+	+	Todos los medios
Picloram	0.21	0.541	+	+	Fe(III)/Fe(II)/H ₂ O/H ₂ O ₂
Trinexapac-etilo	2.77	0.940	+	+	Todos los medios

^a Valor de DF (funcion discriminante) para cada compuesto.

^b Prob. Probabilidad de actividad.

^c los compuestos son clasificados como, activos (+)or inactivos (-) de acuerdo al valor de DF.

^d Media de respuesta quimioluminiscente despues de la irradiación UV.

^e Comportamiento quimioluminiscente muy débil.

Tabla 15. Clasificación teórica y resultados experimentales de los compuestos probados.

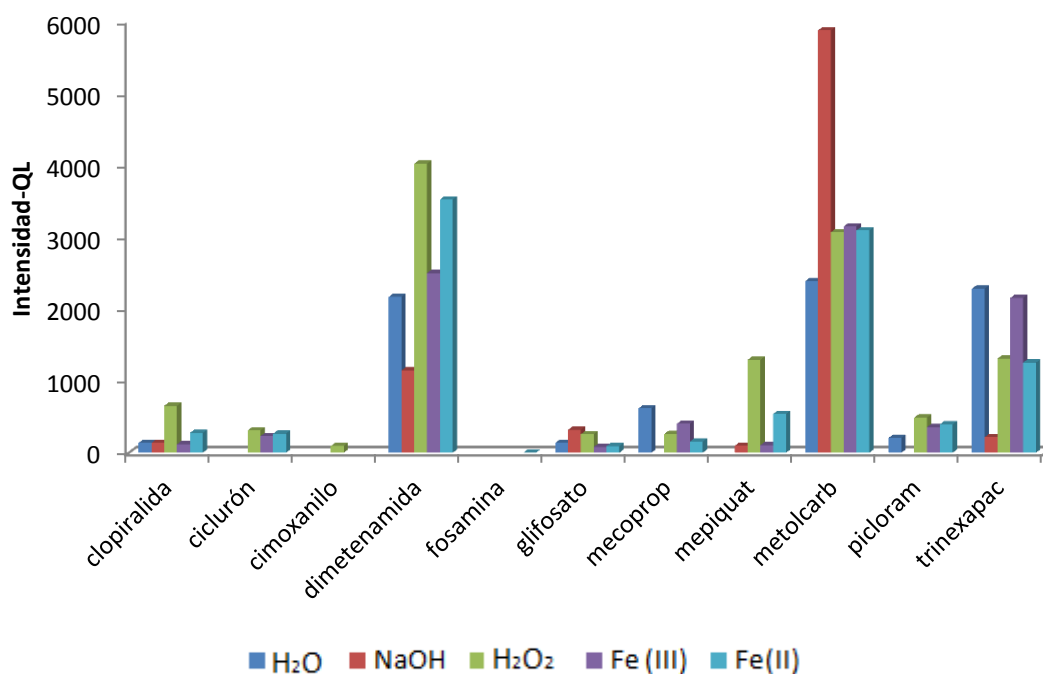


Figura 88. Resultados experimentales de los pesticidas no empleados para el desarrollo y validación de la Función Discriminante (FD).

5.5. Conclusiones

En el presente trabajo se pone de manifiesto que la conectividad molecular es una eficaz herramienta analítica para la predicción de la propiedad molecular quimioluminiscencia fotoinducida aplicada a pesticidas, si bien, en realidad se trata de dos propiedades interrelacionadas: la susceptibilidad frente a la fotodegradación con luz ultravioleta procedente de las lámparas de mercurio de baja presión, y la respuesta quimioluminiscente de los fotofragmentos producidos en el proceso previo.

La predicción teórica de la quimioluminiscencia fotoinducida permite obtener información muy útil para el posterior desarrollo de métodos analíticos que se beneficien de las excelentes características de la quimioluminiscencia como sistema de detección (ver capítulo VI).

Por otra parte, el empleo de metodologías de flujo con un alto grado de automatización como es el caso de la multiconmutación, permite obtener rápidamente gran cantidad de información experimental para alimentar el modelo matemático de conectividad. De este modo, a partir de un número relativamente elevado de pesticidas se puede generar los grupos de entrenamiento y test de analito activos e inactivos que son necesarios para el desarrollo de la Función Discriminante (FD), así como evaluar la probabilidad de que un pesticida presente quimioluminiscencia fotoinducida.

De las tablas 14 y 15, se desprende una excelente correlación entre los resultados experimentales y los valores de probabilidad y de la Función Discriminante obtenidos

en el desarrollo del modelo de conectividad. En el grupo de entrenamiento se observó un porcentaje de coincidencia entre la clasificación teórica y experimental del 90 y 95,5% para el grupo de activos e inactivos respectivamente. Por otra parte, para el grupo de prueba o test, estos porcentajes fueron del 100% y del 90% para los pesticidas clasificados como activos e inactivos respectivamente.

Finalmente, la bondad del modelo desarrollado, se confirmó con la aplicación de la Función Discriminante (FD) a estructuras no empleadas en el desarrollo y validación de la función DF. La viabilidad de la predicción teórica de la quimioluminiscencia fotoinducida de pesticidas, se confirmó experimentalmente, mediante pruebas en el sistema de flujo por multiconmutación para los pesticidas teóricamente clasificados como activos. Se encontró una buena correlación para los compuestos ensayados.

CAPÍTULO VI

DETERMINACIÓN DE IMIDAZOLINONAS POR

QUIMIOLUMINISCENCIA FOTOINDUCIDA

CAPÍTULO VI

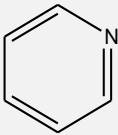
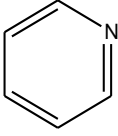
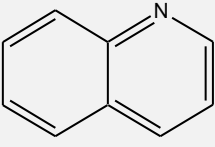
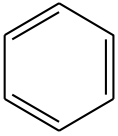
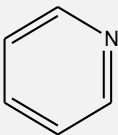
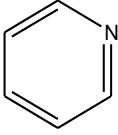
DETERMINACIÓN DE IMIDAZOLINONAS POR QUIMIOLUMINISCENCIA FOTOINDUCIDA

6.1. Características generales de las imidazolinonas

Las imidazolinonas son una clase relativamente nueva de herbicidas, aparecieron por primera vez en 1981. Son los herbicidas más utilizados por los agricultores de todo el mundo para el control de malezas, además porque no son tóxicos para los animales y son altamente selectivos. Estos herbicidas son absorbidos por las raíces y las hojas de las plantas, son transportados por el floema y el xilema y se acumulan en las zonas de crecimiento de la planta. Su modo de acción se basa en la inhibición de la enzima acetohidroxiácido sintasa (AHAS), ésta es esencial en el proceso de síntesis de los aminoácidos de cadena ramificada en la planta (valina, leucina e isoleucina). Las imidazolinonas producen fitotoxicidad, debido a la deficiencia de esos aminoácidos, lo que provoca una disminución de la síntesis de proteínas, esto afecta a la división celular y a la translocación de fotosintatos en los puntos de crecimiento. Esos procesos provocan reducción del crecimiento de las plantas y de la elongación de las hojas, clorosis, necrosis y muerte de las plantas [416].

Los requisitos estructurales básicos para los herbicidas de la familia imidazolinonas, son: poseer un anillo aromático (piridina, quinolina o benceno), un ácido carboxílico o carboxiéster y un anillo adyacente orto-imidazolinona. Las

estructuras químicas y los usos principales de imidazolinonas se resumen en la siguiente tabla.

Herbicida	Anillo aromático	R ₁	R ₂	Usos comunes
Imazamox		CH ₃ OCH ₂	H	Habas de soja, cacahuetes
Imazapir		H	H	Silvicultura
Imazaquin		H	H	Habas de soja
Imazametabenzmetil		5-Me/6-Me	Me	Cereales, girasol
Imazapic		5-Me	H	Legumbres, habas de soja
Imazetapir		5-Et	H	Cacahuetes, pasto

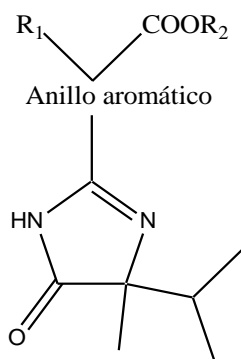


Tabla 16. Estructura molecular de las imidazolinonas y sus usos comunes.

Imazapir, imazaquín, imazametabenz-metil (en realidad una mezcla de imazametabenz A (2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-4,5-dihidro-1H-imidazol-2-il)-5-metil-benzoico) e imazametabenz B (2-(4-isopropil-4-metil-5-oxo-4,5-dihidro-1H-imidazol-2-il)-4-metil-benzoico) e imazetapir fueron seleccionados entre la familia de imidazolinonas por criterios de variabilidad de la estructura química. Imazapir y imazetapir presentan un anillo de piridina aromático mientras imazaquín e imazametabenz-metil exhiben un anillo de quinolina y benceno, respectivamente. Imazapir, imazaquin e imazetapir son ácidos carboxílicos, presentando imazemetabenz-metil un grupo carboximetilo. Además, imazapir e imazaquin no presentan el metilo del imazametabenz-metil ni el etilo del imazetapir conectados al anillo aromático (tabla 16).

6.2. Métodos analíticos en la determinación de imidazolinonas

En el análisis ambiental de imidazolinonas, se incluyen métodos analíticos de HPLC con detección UV [417-419], espectrometría de masas [420], HPLC utilizando fases estacionarias quirales [421], técnicas acopladas, tales como CG/MS [422], e inmunosensores de fibra óptica [423-424].

Si bien son pocos los trabajos publicados dedicados a la determinación de herbicidas de la familia de las imidazolinonas, se ha estudiado con cierto detalle la fotodegradación de este grupo de pesticidas; Curran et al. [425] han abordado el estudio de la fotodegradación en disolución acuosa y suelos de imazaquin, imazetapir, imazapir e imazametabenz-metil; Kivet et. al. [426] han estudiado el comportamiento

de imazamox e imazapir frente a la hidrólisis y fotodegradación, haciendo un seguimiento de los fotoproductos mediante LC-UV y realizando una caracterización de los mismos por LC-MC. Más recientemente, se ha estudiado la cinética de la hidrólisis y fotodegradación en condiciones abióticas de imazapir, imazetapir e imazaquin [427] observándose la inexistencia de enantioselectividad en la fotodegradación al emplear imazaquin como compuesto test.

Debido a la simplicidad, bajo coste, alta sensibilidad y selectividad, la detección basada en la quimioluminiscencia (QL), se ha convertido en los últimos años en una herramienta muy útil en la detección de metodologías en flujo. No obstante, las técnicas quimioluminiscentes para el análisis de residuos de plaguicidas, han sido limitados por el hecho de que, relativamente pocos de estos compuestos son fuertemente quimioluminiscentes. Esto se puede superar mediante diferentes estrategias de análisis, como quimioluminiscencia fotoinducida [388, 428-430]. Por otro lado, el uso de múltiples microelectroválvulas solenoides estratégicamente posicionadas en el sistema de flujo (multiconmutación) ha conducido a logros significativos, principalmente en relación con la mejora de las características analíticas del análisis de flujo: el incremento de la reproducibilidad, la reducción del consumo de muestra y reactivos, así como el aumento del grado de automatización y de la versatilidad de los sistemas de flujo multiconmutados.

Debido a su potencial analítico, la multiconmutación se ha aplicado también al análisis cuantitativo de pesticidas (ver tabla 6). La finalidad del presente trabajo es desarrollar un método analítico sencillo para la determinación de herbicidas de la

familia de las imidazolinonas utilizando un sistema de flujo multiconmutado totalmente automatizado e implementando la quimioluminiscencia fotoinducida. Los fotoproductos se determinan por quimioluminiscencia directa empleando como oxidante permanganato potásico en medio ácido. El método se aplica a la determinación de imidazolinonas en aguas potables y minerales. El método permite la determinación de los herbicidas imazaquín, imazapir e imazametabenz-metil por quimioluminiscencia fotoinducida. Estos herbicidas presentan quimioluminiscencia nativa muy débil o nula. No se han encontrado en la bibliografía referencias dedicadas a la determinación quimioluminiscente de imidazolinonas.

EXPERIMENTAL

6.3. Ensayos previos

En primer lugar, se estudió la fotodegradación de imidazolinonas en diferentes medios combinados con la detección quimioluminiscente, ya que se trata de pesticidas que no presentan quimioluminiscencia nativa. Este estudio es comentado en el capítulo IV de la presente memoria. La concentración de imidazolinona empleada en los ensayos previos fue de $2,62 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

El sistema está compuesto por tres válvulas solenoides, cada una actúa como un interruptor independiente. Dos de los tres puertos de la válvula están conectados permanentemente. La bomba peristáltica se coloca después del detector, la muestra y los reactivos son conducidos al detector mediante aspiración, con un caudal de 10 mL min^{-1} . El sistema de flujo utilizado se representa en la figura 89.

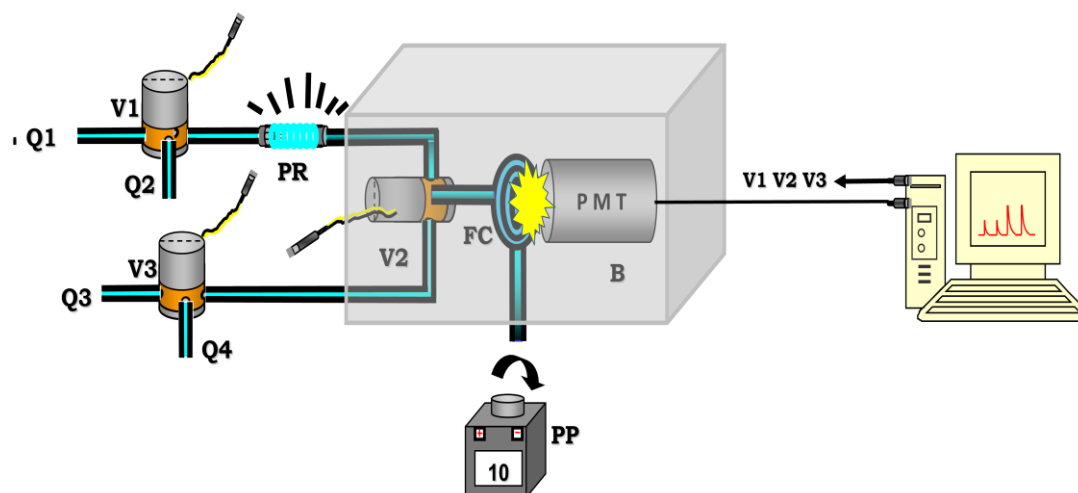


Figura 89. Sistema de flujo utilizado en la determinación de imidazolinonas.

- Ensayos preliminares: Q₁: disolución acuosa de imidazolinona ($2,62 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$); Q₂: medio de fotodegradación ($\text{NaOH } 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; $\text{H}_2\text{O}_2 \text{ } 0,05\%$; H_2O ; $\text{Fe(II) } 6 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $\text{Fe(III) } 6 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$); Q₃: oxidante ($\text{KMnO}_4 \text{ } 7 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ / $\text{H}_2\text{SO}_4 \text{ } 2 \text{ mol L}^{-1}$); Q₄: agua desionizada.
- Montaje optimizado: Q₁: disolución pesticida; Q₂: fotosensibilizador: acetonitrilo 5%; Q₃: oxidante ($\text{KMnO}_4 \text{ } 2 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ / $\text{H}_2\text{SO}_4 \text{ } 2 \text{ mol L}^{-1}$); Q₄: agua desionizada. V1, V2 y V3: válvulas solenoides; PR: fotorreactor; PP: bomba peristáltica (caudal 10 mL min^{-1}); PMT: tubo fotomultiplicador; FC: celda de flujo en espiral; B: caja estanca a la luz.

La secuencia de inserción empleada en los estudios preliminares se describe en la figura 90. Todos los plaguicidas se examinaron con la lámpara apagada (OFF) y encendida (ON).

En primer lugar, se llevan a cabo 50 microinserciones alternadas de pesticida y medio de fotodegradación. Durante cada microinserción V1 permanece activa durante 0,4 s (Q1 aspira imidazolinona) y se desactiva durante 0,2 s (Q2 aspira medio de fotodegradación).

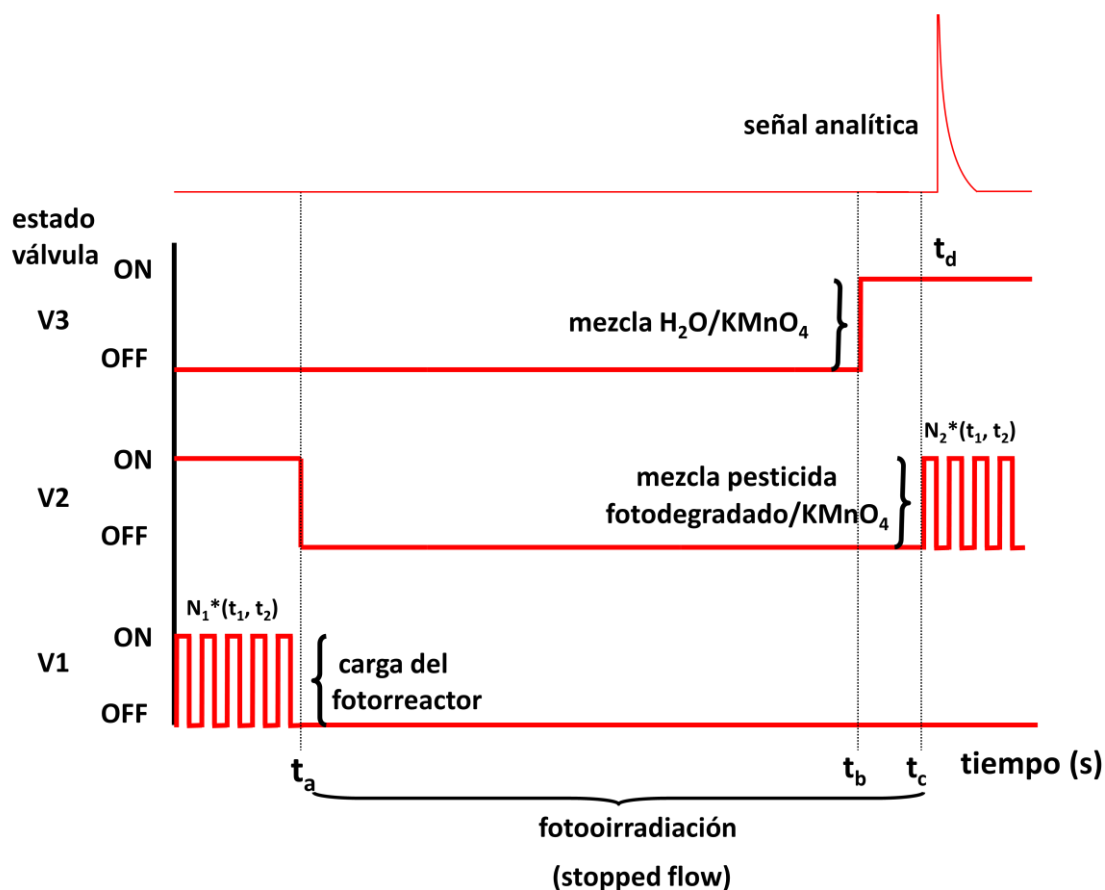


Figura 90. Perfil de inserción para los ensayos previos.

- a) Ensayos preliminares: $N_1=50^*(0.4,0.2)$; $N_2=30^*(0.6,0.2)$; $t_a=30$ s; $t_b=165$ s; $t_c=180$ s; $t_d=40$ s.
 b) Montaje optimizado: $N_1=30^*(0.4,0.2)$; $N_2=30^*(0.6,0.2)$; $t_a=18$ s; $t_b=273$ s; $t_c=289$ s; $t_d=39$ s.

Durante los 30s en los que la inserción de la muestra se lleva a cabo, V2 permanece en ON, permitiendo que el fotorreactor se llene de la mezcla de pesticida/medio de fotodegradación. Este tiempo de carga también se utiliza para lavar las paredes internas del fotorreactor evitando la contaminación cruzada. A continuación, V1 y V2 se desactivan al mismo tiempo y se detiene el flujo durante 150s (tiempo de fotoirradiación UV). Previamente a la reacción de quimioluminiscencia (165 s), el reactivo oxidante (KMnO_4 (Q3)) se aspira al activar la válvula V3. A continuación,

V2 se activa y se insertan 30 microsegmentos alternados de plaguicida fotodegradado y de reactivo oxidante. Se obtiene una señal analítica de quimioluminiscencia transitoria que retorna a la línea base, estando el sistema listo para un nuevo ciclo.

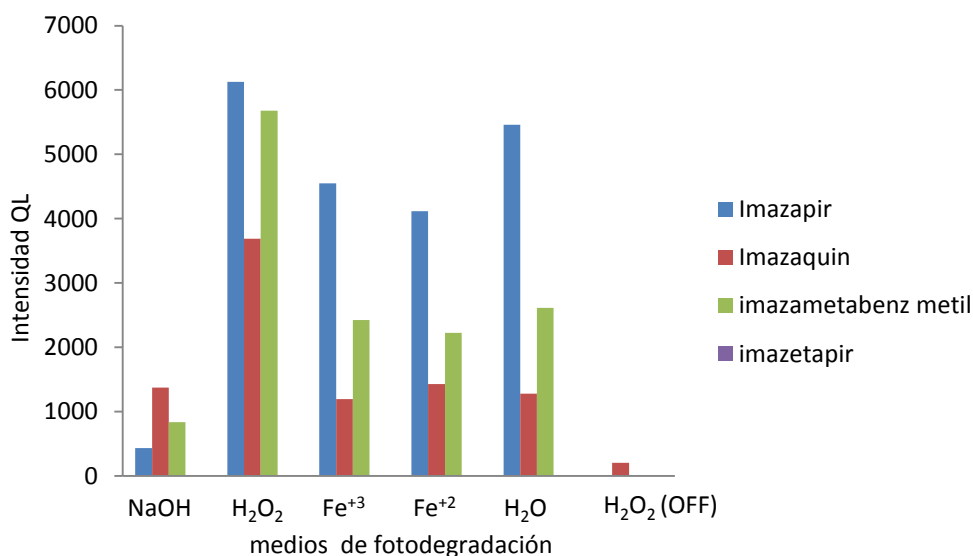


Figura 91. Estudio de los medios de fotodegradación para las imidazolinonas.

Los resultados obtenidos se resumen en la figura 91. Se observó ausencia de quimioluminiscencia nativa o una respuesta quimioluminiscente muy débil ($\leq 3 \times$ ruido de fondo) para todos los pesticidas ensayados con la lámpara en OFF en todos los medios, excepto para el imazaquin con H₂O₂, para el cual se obtuvo una señal analítica claramente distinguible del ruido de fondo. Sin embargo, la radiación UV convierte a estas moléculas (imidazolinona fotoirradiada) en compuestos quimioluminiscentes en todos los medios después de la fotoirradiación. Una excepción a este comportamiento es el imazetapir, el cual, presenta en todos los medios, tras la fotodegradación, intensidad de quimioluminiscencia indistinguible del ruido de fondo.

Finalmente, el agua desionizada se seleccionó como medio de fotodegradación en respuesta a la simplificación y robustez química del sistema, la ausencia de señal analítica con la lámpara en OFF, y por los altos valores de señal quimioluminiscente, a pesar que el medio H₂O₂ muestra señales más elevadas.

Los resultados obtenidos fueron consistentes con los recogidos en la literatura. Las imidazolinonas experimentan una hidrólisis lenta y se fotodegradan rápida y extensamente en disolución acuosa. Por otra parte, la luz ultravioleta provoca una degradación cuantitativa de imidazolinonas [425, 431]. El esquema de la degradación fotoquímica de imazapir e imidazolinonas parece ser muy similar, tal como ha puesto de manifiesto el estudio realizado en disolución acuosa utilizando cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas [432]. Los fotoproductos que aparecen durante la irradiación UV indican que la degradación de imidazolinonas por irradiación UV ocurren principalmente en el anillo de imidazolinona y conduce a derivados de la piridina.

6.4. Optimización de parámetros físico-químicos

Los parámetros físico-químicos objeto de estudio y por este orden fueron: tiempo de fotodegradación, concentración del sistema oxidante, estudio de fotosensibilizadores, caudal del sistema de flujo y perfil de inserción. El estudio de los parámetros físicos y químicos se llevaron a cabo empleando una disolución acuosa de 20 mg L⁻¹ de imazapir como sustancia test.

6.4.1. Influencia del tiempo de fotoirradiación

El efecto del tiempo de exposición a la luz UV se estudió modificando el tiempo de flujo detenido (tiempo de V2 en OFF) entre 30 y 210 s. Los resultados observados se muestran en la figura 92. El rendimiento de fotodegradación aumentó con el tiempo de irradiación. La señal analítica se incrementó de forma significativa hasta 180s (tiempo seleccionado); tiempos de fotoirradiación superiores provocaron una disminución de la intensidad quimioluminiscente.

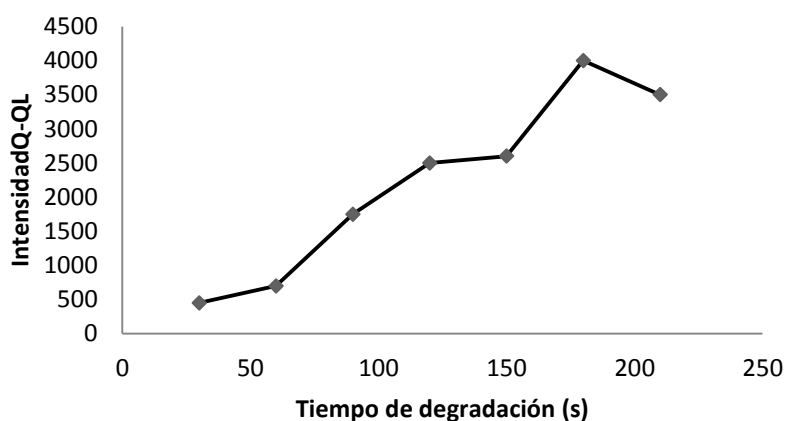


Figura 92. Optimización del tiempo de fotodegradación.

6.4.2. Optimización de la concentración de oxidante

La concentración del permanganato, es una variable crítica y en particular de los sistemas quimioluminiscentes que hacen uso de oxidantes fuertes. Una concentración demasiado baja de reactivo oxidante puede disminuir la señal quimioluminiscente hasta llegar a ser indetectable, mientras que las concentraciones altas pueden conducir a problemas asociados de auto-absorción de la emisión quimioluminiscente

por el propio oxidante. La influencia de la concentración de KMnO_4 se examinó en el intervalo de $8 \cdot 10^{-5} \text{ mol} - 2 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (figura 93).

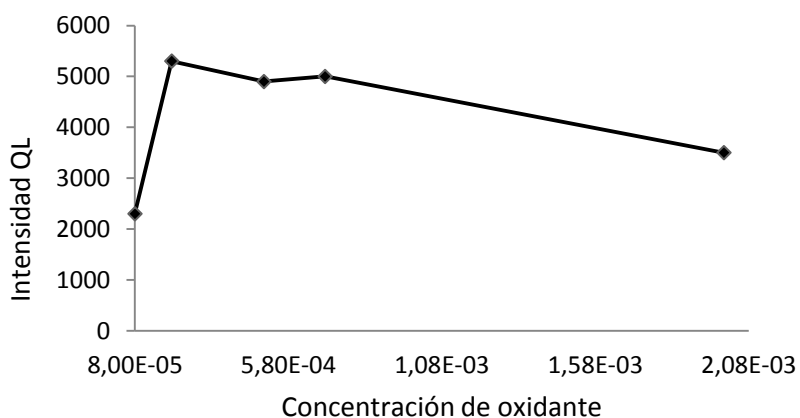


Figura 93. Optimización de la concentración de KMnO_4

La quimioluminiscencia máxima se observa para $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ preparada en ácido sulfúrico 2 mol L^{-1} .

6.4.3. Estudio de fotosensibilizadores

Se estudió la influencia de diversos fotosensibilizadores y/o potenciadores de la quimioluminiscencia. Estos compuestos se pueden dividir en los siguientes grupos según su función:

- Compuestos que generan radicales libre o favorecen un mecanismo de fotodegradación mediada por radicales (por ejemplo, dioxano, dimetilformamida, acetona, ácido fórmico, acetonitrilo, THF, etanol [433]).

- b) Compuestos que proporcionan los medios organizados y la rigidez estructural al medio, que actúan aumentando la vida media de las especies emisoras (β -ciclodextrinas, tensioactivos aniónicos, catiónicos y neutros: SDS, hexadecilpiridinio, tritón X-100, respectivamente) [434].
- c) Sustancias frecuentemente utilizadas en quimioluminiscencia como sensibilizadores que aumentan la intensidad de emisión debido a un mecanismo de transferencia de energía (por ejemplo, rodamina B y 6G [82], y quinina [435]).

El montaje de flujo utilizado para el estudio (figura 89), comprende: Q1 (agua desionizada como blanco o pesticida), Q2 (fotosensibilizador/QL-potenciador), Q3 (oxidante) y Q4 (agua desionizada) fueron aspirados de acuerdo con el siguiente ciclo de inserción múltiple: V1=50*(0.4,0.2); V2=30(ON),150(OFF),50*(0.6,0.2) y V3=180(OFF),35(ON). Todos los compuestos fueron probados con la lámpara encendida y apagada. Del mismo modo, se obtuvieron resultados de blancos con la lámpara de encendida y apagada (la disolución de pesticidas fue reemplazada por agua desionizada). Esto permite evaluar la influencia del sensibilizador tanto en la etapa de fotodegradación como en la reacción de quimioluminiscencia.

Las disoluciones acuosas preparadas de sensibilizadores fueron: SDS (0,015%), quinina ($1 \cdot 10^{-5}$ mol L⁻¹), Tritón-X (0,5%), hexadecilpiridinio ($5 \cdot 10^{-4}$ mol L⁻¹), acetona (0,5%), acetona(0,5%)-acetonitrilo (5%), acetonitrilo (5%), dimetilformamida (5%),

tetrahidrofurano (THF) (5%), Cu (II) ($5 \cdot 10^{-4}$ mol L⁻¹), β -ciclodextrinas (10^{-5} mol L⁻¹), 1,4-dioxano (5%), ácido fórmico (5%), rodamina B, $6G(5 \cdot 10^{-4}$ mol L⁻¹).

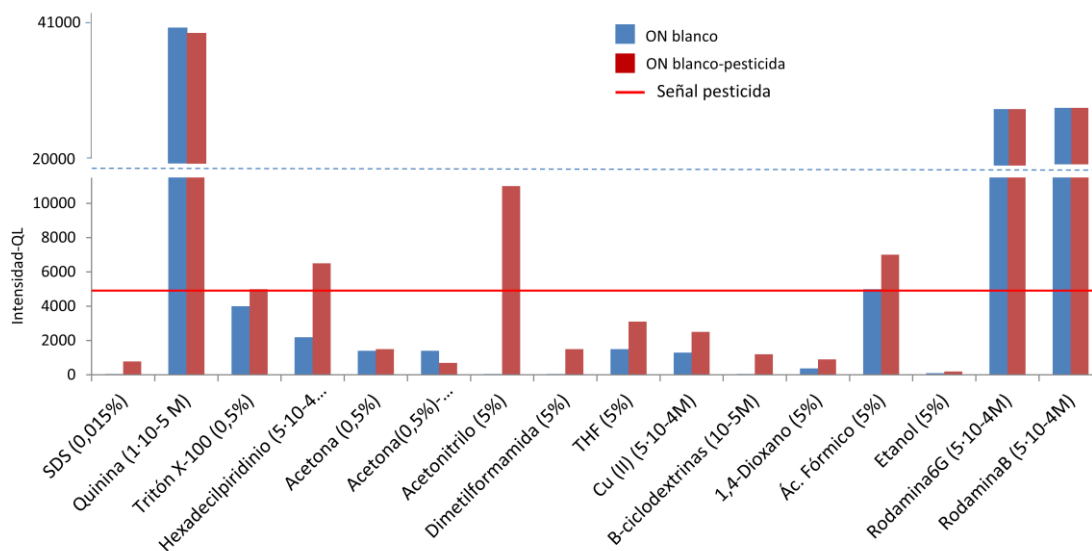


Figura 94. Estudio de sensibilizadores para las imidazolinonas.

En la figura 94, aparecen representadas las intensidades de quimioluminiscencia para el blanco de sensibilizador (V2 agua desionizada y sensibilizador con lámpara ON) y para pesticida/sensibilizador (V2 pesticida y sensibilizador con lámpara en ON). Los resultados permiten realizar una clasificación de los fotosensibilizadores/potenciadores de la QL estudiados en cuatro grupos:

- a) Comprende aquellos compuestos que presentan blancos de sensibilizador muy altos, en algunos casos equiparables a la señal analítica obtenida en presencia de pesticida (quinina, rodamina B y 6G); un comportamiento similar pero presentando intensidades de quimioluminiscencia inferiores tanto para el blanco de sensibilizador, como en presencia de pesticida, se observaron con Triton X-100, hexadecilpiridinio, THF, Cu(II) y ácido fórmico.

- b) Un segundo grupo estaría constituido por aquellos sensibilizadores que presentaron blancos muy bajos prácticamente indistinguibles de la línea base, pero que en presencia de pesticida proporcionaron señales inferiores a la de referencia (5000 cuentas, V2 pesticida y agua desionizada, lámpara en ON). Entre ellos: SDS, β -ciclodextrinas, 1,4-dioxano y etanol.
- c) Como caso aislado, entre los sensibilizadores ensayados se encuentra la mezcla acetonitrilo-acetona, para la cual la señal del blanco duplica a la señal obtenida en presencia del pesticida.
- d) Únicamente, el acetonitrilo (5%) proporcionó ausencia de blanco de sensibilizador, incrementando la intensidad de quimioluminiscencia un 120% respecto a la señal de referencia. Por este motivo fue seleccionado, procediendo a la optimización de su concentración en el intervalo 5-40%. La QL aumentó con la concentración de acetonitrilo; sin embargo, se seleccionó una concentración de acetonitrilo al 5% como óptimo, ya que concentraciones cercanas y superiores a 10% de acetonitrilo deforman con el tiempo el tubo de la bomba peristáltica, provocando variaciones en el caudal que repercuten de forma significativa en la reproducibilidad.

6.4.4. Reoptimización del tiempo de fotodegradación

Como resultado de los cambios en el medio de la fotodegradación y previo a la optimización de los parámetros de flujo, el tiempo de fotodegradación del herbicida se reoptimizó en un intervalo de 150-270 s (figura 95). La señal analítica obtenida para

un tiempo de fotoirradiación de 270 s supuso un incremento del 30% respecto a los 180 s empleados en los ensayos previos.

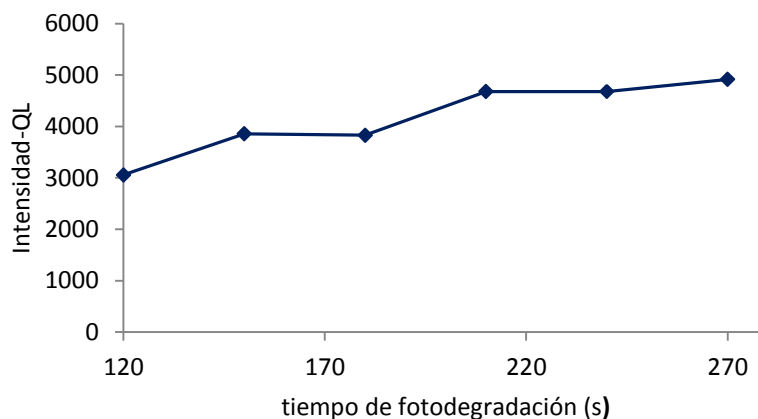


Figura 95. Reoptimización del tiempo de fotodegradación.

6.5. Optimización del sistema de flujo

La configuración física del sistema de flujo es la misma para todos los experimentos realizados en el presente trabajo. El sistema de flujo se desarrolla como un sistema flexible, en el que los elementos solenoides se controlan independientemente y donde la reconfiguración de los parámetros del sistema es posible sin necesidad de modificar físicamente el sistema de flujo.

La optimización de los parámetros de flujo del sistema se efectuó mediante un proceso univariante. Los parámetros optimizados fueron: el caudal del sistema de flujo proporcionado por la bomba peristáltica, y aquellas variables que afectan al perfil de inserción de muestra y reactivos, como son: la secuencia, el número y la duración de impulsos electrónicos que activan a las válvulas solenoides, siendo estos últimos controlados via software.

6.5.1. Optimización del caudal del sistema de flujo

Esta variable se estudia en el intervalo comprendido entre 7,1 y 12,8 mL min⁻¹ (figura 96). La experiencia se realizó empleando una concentración de 50 mg L⁻¹. Caudales inferiores a 7,1 mL min⁻¹ se descartan debido a la rápida cinética de la reacción quimioluminiscente; para los caudales inferiores del intervalo estudiado se observaron señales irreproducibles, debido probablemente al patrón de mezclado obtenido, entre pesticida fotodegradado y el oxidante, al conmutar V2.

Por otro lado el aumento de la velocidad de flujo provocó un incremento en la intensidad de la señal quimioluminiscente; sin embargo, también se produjo en el mismo sentido un aumento significativo de la irreproducibilidad. El flujo pulsante proporcionado por la bomba peristáltica a caudales elevados afecta seriamente a la reproducibilidad de las micro-inserciones de reactivos y a la mezcla posterior en el fotorreactor y en la celda de flujo.

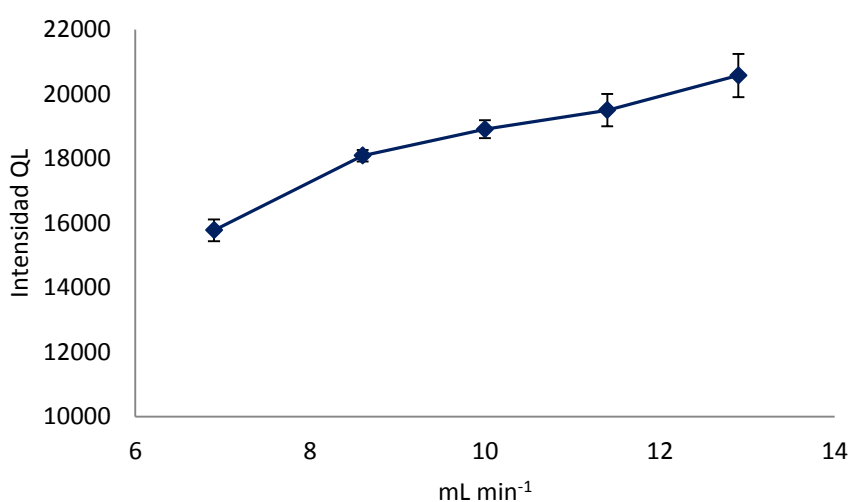


Figura 96. Optimización del caudal del sistema de flujo. ([Imazapir]= 50 mg L⁻¹)

La velocidad de flujo seleccionada para aspirar la muestra y disoluciones de reactivos fué de 10 mL min^{-1} , para lo cual se obtuvo la mejor relación entre la señal analítica y la reproducibilidad.

6.5.2. Optimización de los perfiles de inserción

La eficacia de la mezcla de la muestra y las disoluciones de reactivo puede ser controlados en el sistema de flujo vía software. V1 controla la mezcla de pesticidas y sensibilizador en el fotorreactor, V3 controla la inyección de oxidante (V3 ON) o agua (V3 OFF) por V2 OFF, y V2 alterna la inserción de pesticida fotoirradiado y el sistema oxidante. La optimización del perfil de inserción permite encontrar para cada válvula solenoide la mejor combinación $N^*(t_1, t_2)$, donde t_1 es el tiempo en que la válvula permanece activada (ON), t_2 es el tiempo en que la válvula permanece desactivada (OFF), y N es el número de ciclos ON/OFF. Para cada válvula y de forma independiente se optimizó y por este orden, primero N, y a continuación t_1 y t_2 . Los intervalos estudiados fueron los siguientes: N (20-60), t_1 y t_2 (0,1-0,9s).

Los resultados se muestran en las figuras 97-100. La concentración de imazapir utilizada fué de 1 mg L^{-1} .

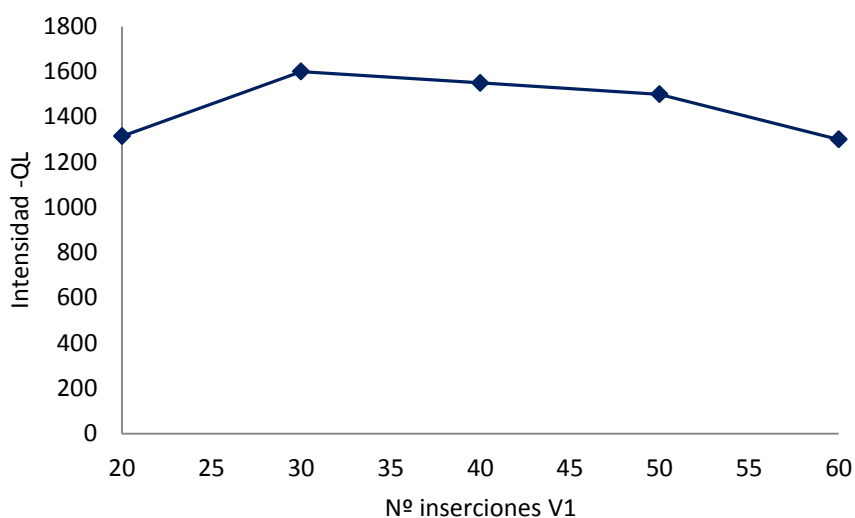


Figura 97. Estudio del número de inserciones en V1.

Son necesarias un número de inserciones de pesticida sensibilizador para llenar el sistema de flujo comprendido entre V1 y V2, correspondiente al fotorreactor. Para posteriores experiencias se seleccionó un número de inserciones de 30 para V1.

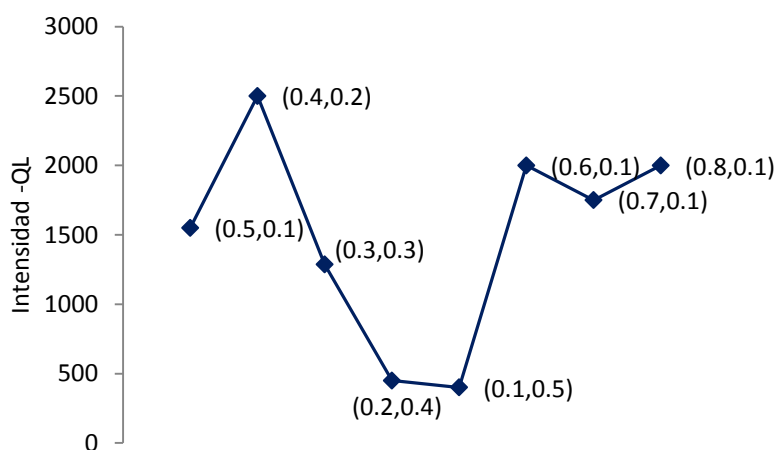


Figura 98. Optimización de la proporción de mezcla en V1.

Los primeros puntos de la figura 98 mantienen un mismo volumen de mezcla pesticida/sensibilizador insertado ($t_1+t_2 = cte$). Se observó que los resultados mas favorables se obtuvieron cuando $t_1 > t_2$, esto es, cuando no hay una dilución preferente

del pesticida; sin embargo, el sensibilizador tampoco debe de ser diluido en exceso, ya que se necesita una cantidad mínima del mismo para ser efectivo en el proceso de fotodegradación y en la consiguiente exaltación de la señal de quimioluminiscencia.

Para la optimización de la mezcla de pesticida/sensibilizador con el medio oxidante, primero se optimizó el número de inserciones en V2 y posteriormente la proporción de mezcla pesticida/sensibilizador (t_1) y sistema oxidante (t_2) en V2. Las figuras 99-100 muestran los resultados obtenidos.

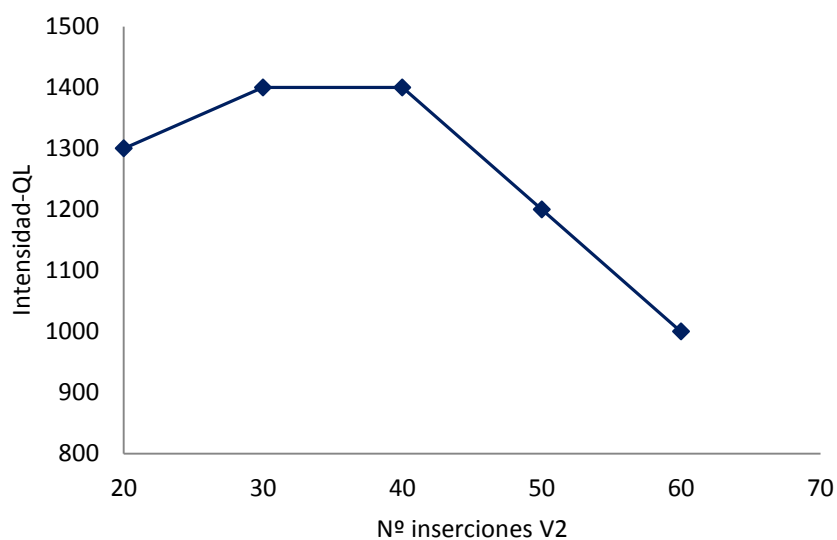


Figura 99. Optimización del número de pulsos en V2.

El número de inserciones óptimas en V2, para que se produzca la señal quimioluminiscente, está comprendido entre 30 y 40 inserciones. En ambos casos, la señal quimioluminiscente apenas varió, por lo que 30 inserciones se consideraron suficientes para llenar la celda en espiral situada delante del tubo fotomultiplicador.

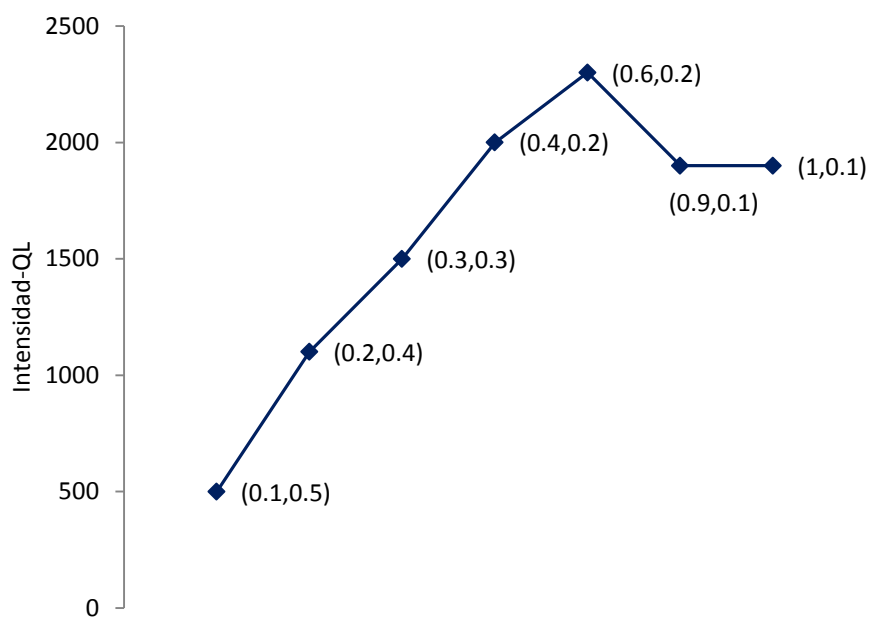


Figura 100. Optimización de la proporción de mezcla en V2.

En cuanto a la proporción de la mezcla pesticida/sensibilizador con la disolución de oxidante (figura 100), se probaron diferentes combinaciones: un volumen menor de pesticida/sensibilizador, volúmenes iguales de pesticida/sensibilizador y de oxidante, y mayor volumen de pesticida/sensibilizador. Se observó, que la mejor proporción entre pesticida/sensibilizador y oxidante fue (0.6,0.2), para la cual, el volumen de pesticida/sensibilizador fué tres veces mayor al volumen de oxidante.

6.6. Resumen de los parámetros físico-químicos y de flujo para el montaje optimizado

Los valores optimos para los parámetros físico-químicos y el perfil de inserción del sistema de flujo se resumen en la tabla 17.

Tiempo de fotodegradación	270 s
Concentración de oxidante	$2 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$
Sensibilizador	Acetonitrilo (5%)
Caudal del sistema de flujo	10 mL min^{-1}
Perfil de inserción	V1: 30*(0.4,0.2) V2: 0,18,270,30*(0.6,0.2),0.5 V3:279,39

Tabla 17. Resumen de los parámetros físico-químicos y de flujo para el montaje optimizado

Es conveniente insertar una secuencia grande de segmentos de muestra y medio de fotodegradación, principalmente debido a la gran longitud de la fotorreactor (150 cm). El número de inserciones de pesticida/fotosensibilizador mezclados con la disolución del oxidante debe ser lo suficientemente elevado para asegurar una mezcla y llenado eficaz en la celda de flujo. Los valores de $t_1/t_2 > 1$ en V1 y V2 deben evitar la dilución excesiva del pesticida en el sistema de flujo. Se obtuvo una excelente reproducibilidad para tiempos de inserción tan cortos como 0,1 s, lo que equivale a la inserción de 16 μL de disolución.

6.7. Características analíticas

Una vez establecidos los valores óptimos del sistema de flujo empleando imazapir como sustancia test, se pasó a estudiar las características analíticas del sistema para cada una de las imidazolinonas.

Una comparación de las características analíticas de los métodos para la determinación de imazapir, imazaquín e imazamethabenz-metil se resumen en la tabla 18.

Parámetros Analíticos	Imazapir	Imazaquín	Imazametabenz-metil
Ecuación (C mg L ⁻¹)	I _{QL} = 300,2 C + 252.6 (r ² = 0,992)	I _{QL} = 349,1 C + 190.7 (r ² = 0,996)	I _{QL} = 168,2 C + 236 (r ² = 0,993)
Intervalo de linealidad (mg L ⁻¹)	0,05-10	0,1-10	0,01-10
Reproducibilidad RSD (%)	12,8	1,1	4,0
Limite de detección (mg L ⁻¹)	0,05	0,1	0,01
Repetitividad¹ RSD(%) (n=10)	1,3/5,2	2,2/2,8	1,4/3,1
Velocidad de muestreo (h ⁻¹)	12	12	12

I_{QL}: Intensidad de quimioluminiscencia (cuentas); ¹para 0.5 and 3 mg L⁻¹.

Tabla 18. Estudio de parámetros analíticos.

La reproducibilidad del día a día se obtuvo como la RSD de la pendiente de tres gráficos de calibrado diferentes obtenidos en distintas sesiones de trabajo, empleando disoluciones de pesticida y reactivos recién preparados. La repetibilidad se calculó utilizando dos concentraciones (0,5 y 3 mg L⁻¹) para una serie de 10 inserciones de cada herbicida. El límite de detección se determinó experimentalmente disminuyendo la concentración del analito hasta que la señal es indistinguible de la línea base. La velocidad de muestreo se obtuvo utilizando las concentraciones de estándares empleadas en el estudio de repetitividad.

El intervalo de linealidad se extendió hasta una concentración de imidazolinona de 10 mg L⁻¹ en todos los casos. La figura 101 muestra un calibrado obtenido para imazapir, así como, picos superpuestos de los estándares empleados en el calibrado.

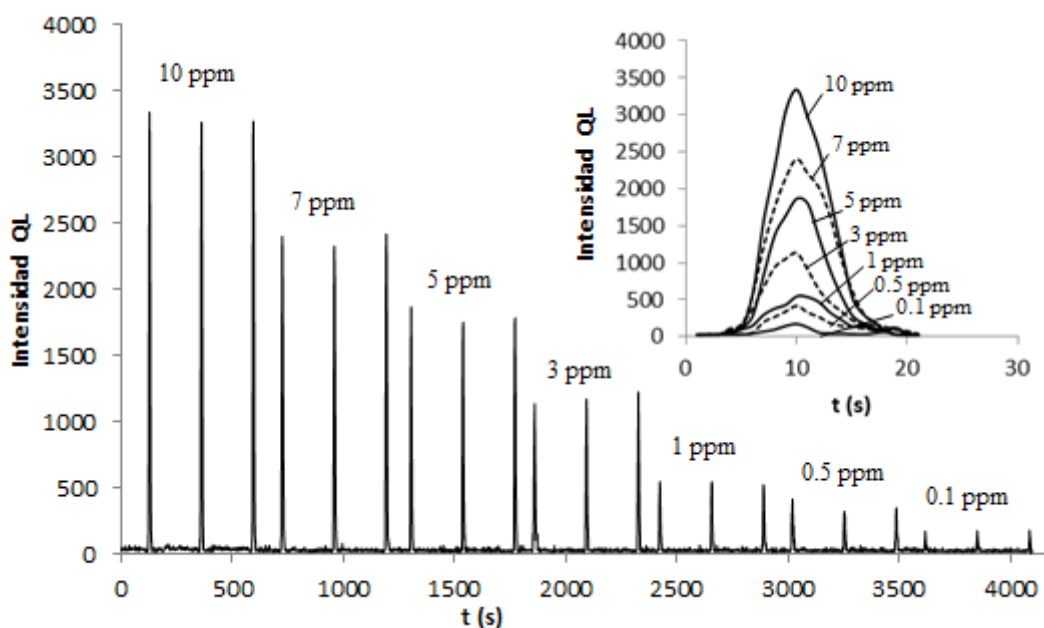


Figura 101. Calibrado de imazapir y forma de las señales analíticas.

La influencia de posibles especies interferentes que acompañan a los pesticidas en muestras reales de imidazolinonas se estudió empleando disoluciones que contenían 2 mg L^{-1} de pesticidas y concentraciones decrecientes de cada especie estudiada. Las señales así obtenidas se compararon con los proporcionados por la solución plaguicida pura con el fin de determinar los errores relativos resultantes de la presencia de la interferencia potencial.

La tabla 19 muestra la relación de concentración ensayada compuesto/pesticida en mg L^{-1} para el cual se no se observó interferencia ($\pm 5\%$ de la respuesta del estándar puro). El efecto de interferencia de los cationes divalentes puede explicarse sobre la base de las propiedades quelantes de las imidazolinonas. El conjunto quelante activo implica donantes más débiles, por ejemplo, la piridina (imazapir) o quinolina (imazaquin) y nitrógenos imidazólicos. La parte lactámica del anillo de imidazolinona se

puede desprotonar, y el ligando queda provisto de un átomo de nitrógeno bastante básico, que asistido por los nitrógenos electrón donante de piridina o quinolina, dan lugar a complejos estables, incrementando la coordinación del ión metálico [436-437]. Las reacciones complejantes pueden afectar a la estabilidad de las imidazolinonas frente a la radiación UV, así como la susceptibilidad para la obtención de fotoproductos quimioluminiscentes.

Interferente	Imazapir	Imazaquin	Imazametabenz-metil
Na⁺	1000	1000	1000
K⁺	<0.1	1000	1000
Ca⁺²	<0.1	1000	1000
NH₄⁺	1000	<0.1	100
Mg⁺²	1000	<0.1	<0.1
Mn⁺²	<0.1	100	1000
Cu⁺²	100	<0.1	<0.1
Zn⁺²	<0.1	<0.1	500
Cl⁻	<0.1	1521	1521
SO₄⁻²	<0.1	<0.1	2086
CH₃COO⁻	3105	3105	<0.1
HCO₃⁻	<0.1	<0.1	<0.1
NO₃⁻	<0.1	<0.1	<0.1

Tabla 19. Estudio de interferentes para imidazolinonas.

6.8. Aplicaciones analíticas

Los métodos desarrollados se aplicaron a la determinación en muestras reales enriquecidas con cada uno de los pesticidas (tabla 20). Las muestras reales utilizadas fueron agua mineral y agua potable.

(A) Muestras de agua potable de la ciudad de Moncada, en Valencia, España. Se diluyeron (1:5) y enriquecieron con disoluciones de plaguicidas estándar para obtener disoluciones que contenían imidazolinonas en las proximidades de 0,5, 3 y 5 mg L⁻¹.

(B) Agua mineral natural Bezoya, Grupo Leche Pascual, S.A., Ortigosa del Monte, Segovia, España. Las muestras de agua mineral fueron enriquecidas con disoluciones estándares de plaguicidas para obtener disoluciones que contenían imidazolinonas en las proximidades de 0,5, 3 y 5 mg L⁻¹.

Se realizó un calibrado para cada pesticida cubriendo el intervalo de linealidad, y se interpolaron las señales obtenidas para las muestras reales. Los errores obtenidos en los ensayos de recuperación se muestran en la tabla 20.

	Agua mineral			Agua del grifo	
	Añadida (mg L ⁻¹)	Encontrada (mg L ⁻¹)	Error (%)	Encontrada (mg L ⁻¹)	Error (%)
Imazapir	0.5	0.53	+6.0	0.40	-20.0
	3.0	3.26	+8.7	3.25	+8.3
	5.0	5.13	+2.6	5.12	+2.4
Imazaquin	0.5	0.45	-10.0	0.46	-0.8
	3.0	2.87	-4.3	2.89	-3.7
	5.0	5.23	+4.6	5.1	+2.0
Imazametabenzmetil	0.5	0.47	-6.0	0.43	-14.0
	3.0	3.02	+0.7	2.96	-1.3
	5.0	4.65	-7.0	4.66	-6.8

Tabla 20. Resultados de los ensayos de recuperación para muestras reales.

6.9 Conclusiones

Se describe un método totalmente automatizado para la determinación de imidazolinonas en aguas.

- El método se basa en la metodología de flujo denominada multiconmutación. Se utiliza un montaje automatizado más simple y más eficaz que los habitualmente empleados en procedimientos analíticos de flujo basados en FIA: las características hidrodinámicas del sistema de flujo se pueden controlar fácilmente a través del software reprogramando la duración de los pulsos electrónicos de conmutación de las válvulas o mediante la alteración de su secuencia de conmutación. La metodología de flujo empleada en el presente trabajo permite llevar a cabo de forma reproducible una serie de operaciones complejas que de otro modo no sería posible realizarlas, dosificando muestra y reactivos mediante pulsos de unos pocos microlitros.

- La fotoirradiación on-line con lámparas de mercurio de baja presión, habitualmente empleadas como germicidas, permite la implementación de un tratamiento en línea de la muestra. Como resultado de la irradiación con luz UV, se favorecen procesos de fotodegradación y fotosensibilización, provocando cambios significativos en la estructura electrónica y química de los plaguicidas de la familia de las imidazolinonas [425-426]. Esta estrategia analítica permite la determinación de imazapir, imazaquín e imazametabenz-metil por quimioluminiscencia fotoinducida, gracias a las propiedades quimioluminiscentes de los fotofragmentos resultantes.

- Consultada la base de datos Web of Science, no se han encontrado publicaciones relacionadas con la quimioluminiscencia directa o indirecta de las imidazolinonas imazapir, imazaquín e imazametabenz-metil, probablemente por tratarse de compuestos que no presentan QL nativa.

- El método propuesto podría ser útil en la detección post-columna en HPLC; los compuestos no quimioluminiscentes separados podrían fotoirradiarse y ser determinados por quimioluminiscencia fotoinducida.

CAPÍTULO VII

DETERMINACIÓN DE AUXINAS POR

QUIMIOLUMINISCENCIA DIRECTA

CAPÍTULO VII

DETERMINACIÓN DE AUXINAS POR QUIMIOLUMINISCENCIA DIRECTA

7.1. Auxinas, reguladores del crecimiento vegetal

Los reguladores del crecimiento vegetal o fitohormonas, son compuestos orgánicos de bajo peso molecular que actúan a muy bajas concentraciones en sitios distantes de donde son producidos, interviniendo en muchos procesos fisiológicos como el desarrollo de tejidos, crecimiento del tallo y la caída de hojas entre otros. Estos reguladores están directamente involucrados en procesos metabólicos o en el proceso de desarrollo, tal es el caso de la producción de amilasa y la inducción de la floración entre otros, pero al actuar en bajas concentraciones modifican dichos procesos, donde sus efectos varían según su interacción con otros reguladores de crecimiento vegetal; de esta forma regulan o influyen en un rango de procesos celulares y fisiológicos entre los que se cuentan la división celular, diferenciación celular, desarrollo de frutos, tropismos, dormancia de semillas, germinación de semillas, senescencia, abscisión de las hojas, entre otras.

Charles Darwin, en su libro *El Poder de Movimiento en las Plantas*, pone de manifiesto la actividad de una sustancia con capacidad para inducir el movimiento frente a una fuente de luz en coleoptilos de *Phalaris canariensis* (alpiste), la cual posteriormente fue identificada como una auxina [438]. Desde entonces han sido

ampliamente estudiadas y juegan un papel central en la regulación del crecimiento de las raíces, promueven la elongación del tallo e inhiben el crecimiento de brotes laterales manteniendo la dominancia apical [439].

7.1.1. Características generales de las auxinas

El nombre auxina se deriva del griego “*auxein*”, que significa aumento o incremento, designando cualquier compuesto constituido por el grupo auxínico, y a menudo se usa como sinónimo al ácido indolacético (IAA). Químicamente son llamadas ácido 3-indol-acético, y son derivados del triptófano. Su estructura básica, se compone de un grupo indol, por lo que es fácil encontrar en las plantas compuestos de estructura similar. Hoy en día se encuentra compuesto de similar acción sintetizados artificialmente.

Son compuestos orgánicos, cuyas estructuras moleculares se presentan en la figura 102.

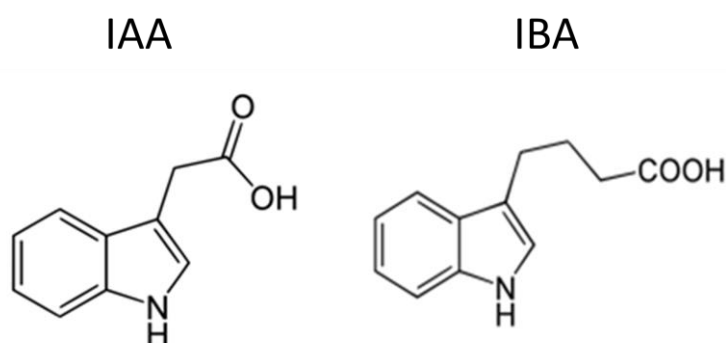


Figura 102. Estructura molecular de IAA (ácido indolil acético) e IBA (ácido indolil butírico)

Para que una sustancia exhiba acción auxínica debe tener un radical ácido o ser fácilmente convertible en él, un anillo aromático y uno a cuatro carbonos entre el carboxilo y el anillo [440]. Todas las auxinas sintéticas causan efectos parecidos pero cada producto individual tiene una aplicación particular dentro de la regulación o acción auxínica [441].

Existen tres grupos auxínicos [440]:

- Derivados del indol como ácido indol propiónico (IPA), ácido indol butírico (IBA) y el ácido 3- indol acético (IAA).
- Derivados del naftaleno, como ácido naftalén acético (NAA), ácido naftoxiacético (Noxa o BNOA), ácido naftilpropiónico (NPA).
- Derivados fenoxi, usados como herbicidas selectivos y algunas veces como reguladores del crecimiento vegetal.

Se encuentran en las células en concentraciones de 10^{-6} - 10^{-8} mol L⁻¹, y su distribución dentro de los tejidos está sujeto a los principios del transporte activo y polar. Si la concentración del compuesto en el tejido aumenta, el efecto que tienen sobre la planta será la inhibición de la elongación de la raíz, lo que produce un efecto herbicida, la razón: es un estímulo en la producción de etileno, mientras que a bajas concentraciones estimula la elongación de los brotes y las raíces [439].

7.2. Métodos analíticos para la determinación de auxinas

La técnica mas comúnmente utilizada para determinar auxinas, es la detección colorimétrica utilizando el reactivo Salkowski [442-443]. Existen otras técnicas de análisis de rutina como las colorimétricas [444], fluorimétricas [445], electroanalíticas

[446-449], las técnicas de cromatografía como HPLC [450-458] o acoplada con espectroscopia de masas [459-462] y electroforesis capilar [463-467].

La quimioluminiscencia ha sido poco empleada en la determinación de auxinas, a pesar de las características analíticas en términos de sensibilidad, rápida respuesta, sencillez e instrumentación relativamente barata. En el trabajo de Xi et.al. [458], el sistema QL empleado para la determinación de IAA e IBA fue el KMnO_4 y Tris(2,2'-bipiridina)rutenio(III), con un intervalo de linealidad de ($5 \cdot 10^{-8}$ - $5 \cdot 10^{-6}$ g mL^{-1}) y ($5 \cdot 10^{-7}$ - 10^{-5} g mL^{-1}) y unos límites de detección de $2 \cdot 10^{-8}$ g mL^{-1} y $2 \cdot 10^{-7}$ g mL^{-1} , respectivamente. En el trabajo de Han et. al. [468], el sistema QL empleado para la determinación de IAA fue KMnO_4 /formaldehído/medio ácido; el intervalo de linealidad fué (0,01 - 10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) y el límite de detección de 1 nmol L^{-1} ; en el trabajo de Kamidate et. al. [469], se determinó IAA empleando luminol como sistema QL, con un límite de detección de $6 \cdot 10^{-6}$ mol L^{-1} .

EXPERIMENTAL

7.3. Estudios previos y selección del sistema oxidante

7.3.1. Estudios previos

Se propone inicialmente un montaje sencillo (figura 103) que utiliza como sistemas propulsores dos bombas solenoides (P1 y P2) y una válvula solenoide (V1) como selector de canal de flujo (Q1 ó Q2).

El pesticida y el sistema oxidante fluyen por canales independientes impulsados por sendas bombas solenoides que propelen 8 μL por pulso. Estos dos canales se conectan a una válvula solenoide que selecciona la disolución de pesticida o de oxidante. Ambas disoluciones se mezclan en las proporciones programadas en la secuencia de inserción. La mezcla se produce inmediatamente antes de llegar a la celda en espiral y la reacción se completa en la misma celda de flujo, donde se registra la señal quimioluminiscente, una señal transitoria típica con forma de pico.

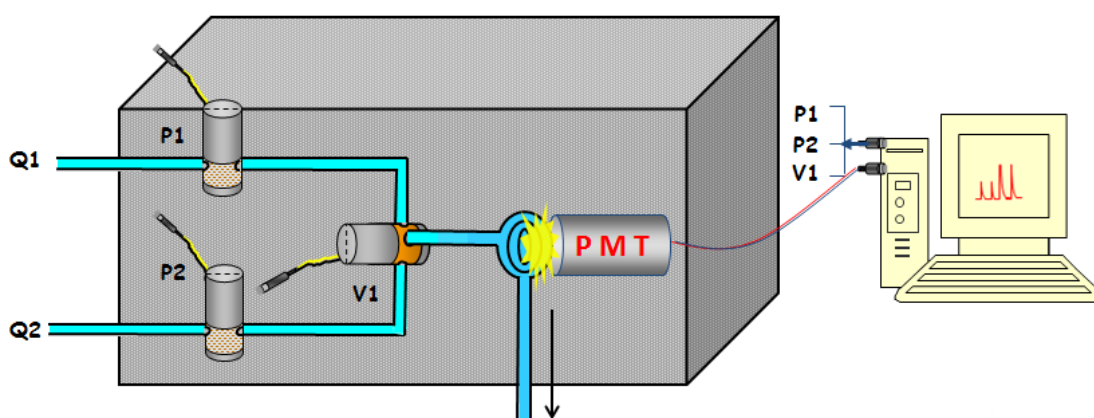


Figura 103. Esquema montaje para la determinación por quimioluminiscencia directa. (P1, P2: bombas solenoides de 8 μL /pulso; V1: válvula solenoide; Q1,Q2: disolución de pesticida y de oxidante; PMT: tubo fotomultiplicador)

Se probaron inicialmente dos secuencias de inserción en el que cambia el tipo de mezclado (figura 104). La cantidad de pesticida y oxidante fué el mismo en ambas secuencias. En la primera secuencia (A) se introdujo primero un frente de pesticida y después la disolución de oxidante. Los mismos impulsos del sistema oxidante, que actúa como portador son los que van a producir la mezcla. En la segunda secuencia (B) se intercalan sándwiches de pesticida y de sistema oxidante.

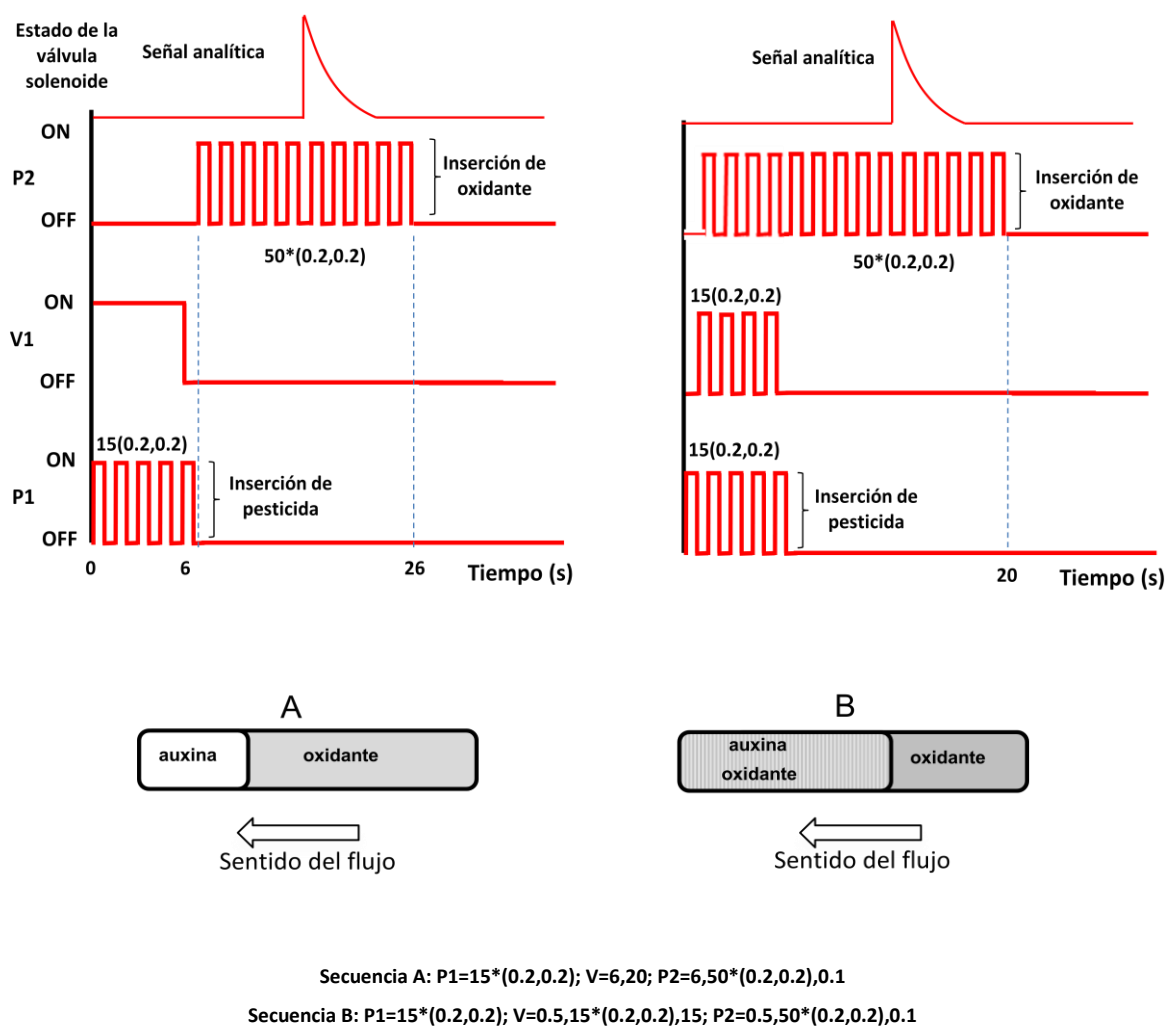


Figura 104. Diagrama del perfil de inserción para las secuencias (A) y (B).

7.3.2. Selección del sistema oxidante

Con el propósito de encontrar el sistema oxidante más apropiado para obtener una señal quimioluminiscente a partir del producto de la reacción de oxidación de los pesticidas, se ensayaron diversos sistemas oxidantes fuertes. Estos sistemas oxidantes son empleados habitualmente en quimioluminiscencia directa [343]. Los oxidantes y los medios ensayados fueron: KMnO_4 ($2 \cdot 10^{-3}$ mol L^{-1})/ H_2SO_4 (1,5 mol L^{-1}), $(\text{NH}_4)_2\text{Ce}(\text{NO}_3)_6$ ($6 \cdot 10^{-3}$ mol L^{-1})/ H_2SO_4 (1,5 mol L^{-1}), $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ($6 \cdot 10^{-3}$ mol L^{-1})/ NaOH (1,5 mol L^{-1}) y N-bromosuccinimida (NBS, $\text{C}_4\text{H}_4\text{BrNO}_2$) ($4 \cdot 10^{-2}$ mol L^{-1})/ NaOH (1,5 mol L^{-1}).

En las tablas 21 y 22 se muestra la respuesta de cada uno de los pesticidas con los diferentes sistemas oxidantes y las diferentes secuencias de inserción propuestas (A y B). La concentración para cada pesticida fue $2,63 \cdot 10^{-4}$ mol L⁻¹, preparados en agua desionizada. El tiempo de integración utilizado fue 1500 ms.

IAA	Secuencia A		Secuencia B	
	Media	RSD (%)	Media	RSD (%)
KMnO ₄ ($2 \cdot 10^{-3}$ mol L ⁻¹)/H ₂ SO ₄ (1,5 mol L ⁻¹)	5305	1,73	2054	2,5
(NH ₄) ₂ (Ce(NO ₃) ₆) ($6 \cdot 10^{-3}$ mol L ⁻¹)/H ₂ SO ₄ (1,5 mol L ⁻¹)	-	-	-	-
K ₃ Fe(CN) ₆ ($6 \cdot 10^{-3}$ mol L ⁻¹)/NaOH (1,5 mol L ⁻¹)	522	4,2	403	4,8
C ₄ H ₄ BrNO ₂ ($4 \cdot 10^{-2}$ mol L ⁻¹)/NaOH (1,5 mol L ⁻¹)	-	-	-	-

Tabla 21. Señales analíticas para IAA con diferentes oxidantes.

IBA	Secuencia A		Secuencia B	
	Media	RSD (%)	Media	RSD (%)
KMnO ₄ ($2 \cdot 10^{-3}$ mol L ⁻¹)/H ₂ SO ₄ (1,5 mol L ⁻¹)	542	6	152	2,9
(NH ₄) ₂ (Ce(NO ₃) ₆) ($6 \cdot 10^{-3}$ mol L ⁻¹)/H ₂ SO ₄ (1,5 mol L ⁻¹)	-	-	-	-
K ₃ Fe(CN) ₆ ($6 \cdot 10^{-3}$ mol L ⁻¹)/NaOH (1,5 mol L ⁻¹)	3682	3	3169	1,6
C ₄ H ₄ BrNO ₂ ($4 \cdot 10^{-2}$ mol L ⁻¹)/NaOH (1,5 mol L ⁻¹)	-	-	-	-

Tabla 22. Señales analíticas para IBA con diferentes oxidantes.

Los resultados obtenidos muestran que el mejor sistema de mezclado entre el pesticida y el sistema oxidante es el propuesto en la secuencia de inserción A, en la que primero se introduce un frente de pesticida y después el sistema oxidante.

Además, se observa que para el IAA el sistema oxidante que mejor funciona es el $\text{KMnO}_4/\text{H}_2\text{SO}_4$, y para el IBA el $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{NaOH}$. En la siguiente figura, se comparan los resultados obtenidos para cada uno de los pesticidas estudiados con los oxidantes.

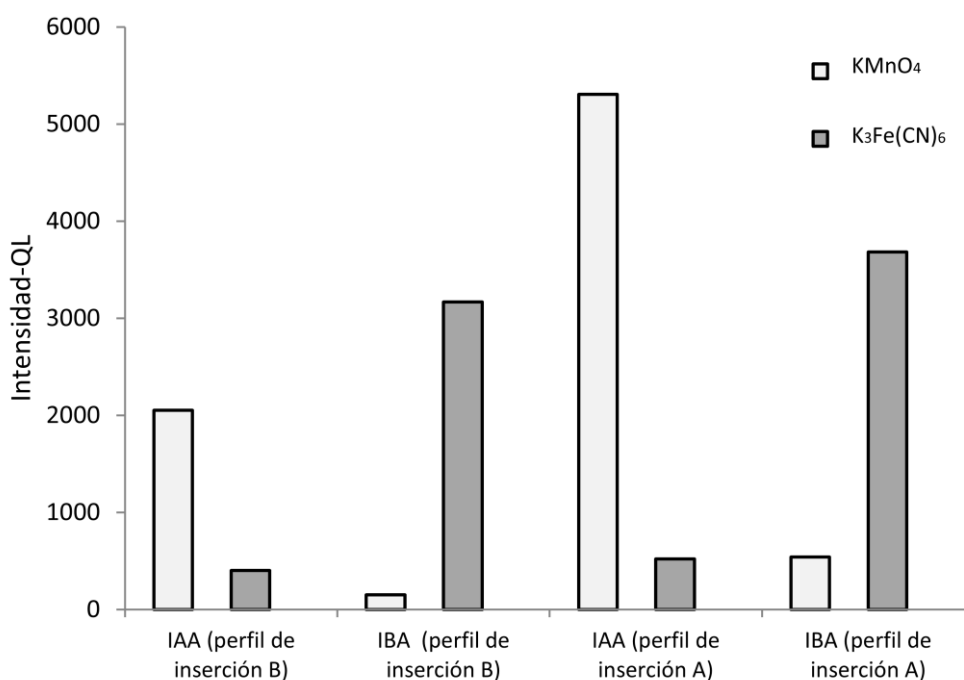


Figura 105. Estudio del comportamiento de IAA e IBA para diferentes oxidantes y diferentes secuencias de inserción.

7.4. Optimización del sistema de flujo

7.4.1. Optimización del montaje y secuencias de multiconmutación

Con los pesticidas IAA e IBA se probaron diferentes secuencias de inserción que van modificando la cantidad de pesticida introducido, y a la vez, se probaron diferentes bombas solenoides que introducen distintos volúmenes de sistema oxidante con cada pulso. De esta modo se optimizó el tipo de mezclado con respecto a la cantidad de pesticida introducido, para así favorecer un mejor mezclado. Para la experiencia se

utilizó la secuencia (A). En la tabla 23 se detallan las condiciones químicas y del montaje.

	IAA	IBA
Concentración pesticida	$2,63 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$	$2,63 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$
Inserciones oxidante	50*(0.2,0.2)	50*(0.2,0.2)
Condiciones químicas del sistema oxidante	$\text{KMnO}_4 (2 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}) / \text{H}_2\text{SO}_4 (1,5 \text{ mol L}^{-1})$	$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6 (6 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}) / \text{NaOH} (1,5 \text{ mol L}^{-1})$
Tiempo integración	1500 ms	1500 ms
Bomba que introduce el pesticida	8 μl	8 μl

Tabla 23. Condiciones analíticas en la optimización de IAA e IBA.

Esta experiencia se realizó para ambos pesticidas, utilizando la bomba de 8 μL para introducir el pesticida y se probaron tres tipos de bomba diferentes (8, 25, 50 $\mu\text{L/pulso}$) para introducir el oxidante. En cada uno de estos montajes se modificó el número de inserciones de pesticida insertado (10–50 inserciones). La figura 106 muestra la influencia del número de inserciones de pesticida en combinación con las tres bombas solenoides (8, 25, 50 $\mu\text{L/pulso}$) empleadas en el bombeo del reactivo oxidante. En la figura se muestran también superpuestos, los picos obtenidos para las combinaciones número de inserciones de pesticida-bomba solenoide que proporcionaron las señales analíticas más altas.

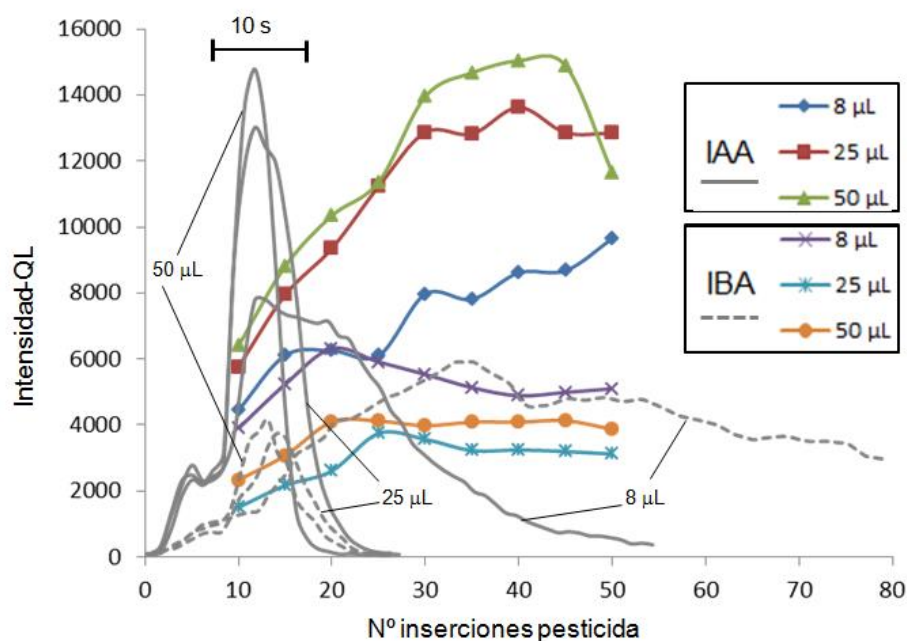


Figura 106. Optimización del montaje y secuencias de inserción.

Como se observa en la figura 106, para ambos pesticidas, la bomba que introduce el oxidante y mejor señal analítica proporciona es la de 50 µL, donde el pico además de proporcionar la señal analítica mayor es el que presenta mejor forma, debido a que con la bomba de 50 µL se produce una menor dispersión y el mezclado más eficiente de pesticida y oxidante. Si se observa la señal proporcionada por la bomba de 8 µL para el oxidante, para un número de inserciones de pesticida superiores a 20, se obtienen picos muy anchos, y se incrementa sensiblemente el tiempo necesario para restaurar la línea base. Al emplear una bomba de 8 µL para impulsar el oxidante y especialmente, cuando el volumen de pesticida insertado en el sistema de flujo es suficientemente grande, se produce un mezclado deficiente, y se requiere un tiempo mayor para que el bolo pesticida-oxidante llegue a la celda y abandone el sistema de

flujo. Consideraciones cinéticas relacionadas con la reacción quimioluminiscente también deben ser tenidas en cuenta.

La señal analítica mejora sensiblemente para la bomba de 25 μL , siendo mejor los resultados para la bomba de 50 μL . El empleo de bombas que dispensan un mayor volumen de oxidante por pulso permite la inserción de un volumen mayor de pesticida sin afectar a la efectividad de la mezcla de ambas disoluciones. Los mejores resultados se obtuvieron empleando 35 y 30 inserciones de pesticida para IAA e IBA respectivamente.

	IAA	IBA
Concentración pesticida	$2,63 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$	$2,63 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$
	V1=35*(0.2,0.2)	V1=30*(0.2,0.2)
Secuencias de inserción	V2=14.2,20	V2=12.2,20
	V3=14.2,50*(0.2,0.2),0.1	V3=12.2,50*(0.2,0.2),0.1
Condiciones químicas del sistema oxidante	KMnO ₄ ($2 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$)/ H ₂ SO ₄ ($1,5 \text{ mol L}^{-1}$)	K ₃ Fe(CN) ₆ ($6 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$)/ NaOH ($1,5 \text{ mol L}^{-1}$)
Tiempo integración	1500 ms	1500 ms
Bomba que introduce el pesticida	8 μl	8 μl
Bomba que introduce el sistema oxidante	50 μl	50 μl

Tabla 24. Resumen condiciones químicas y de flujo del montaje.

7.4.2. Optimización del tiempo de integración

Un factor a tener en cuenta es el tiempo de integración del programa de *Electron Tubes Limited* que controla el tubo fotomultiplicador. El programa permite trabajar con tiempos de integración comprendidos entre 5 ms y 2.500 ms, siendo el máximo

número de medidas permitidas de 32.000, lo cual supone tiempos de lectura en continuo entre 160 s y 22,2 horas de medida en continuo. Las lecturas que se muestran son la media aritmética correspondiente a 5 picos (N=5). Se probaron diferentes tiempo de integración: 500, 1.000, 1.500, 2.000 y 2.500 ms con diferentes concentraciones de pesticida (1, 10, 30 mg L⁻¹). En la siguiente figura, se representan las señales obtenidas para 10 mg L⁻¹ de ambos pesticidas para los diferentes tiempos de integración.

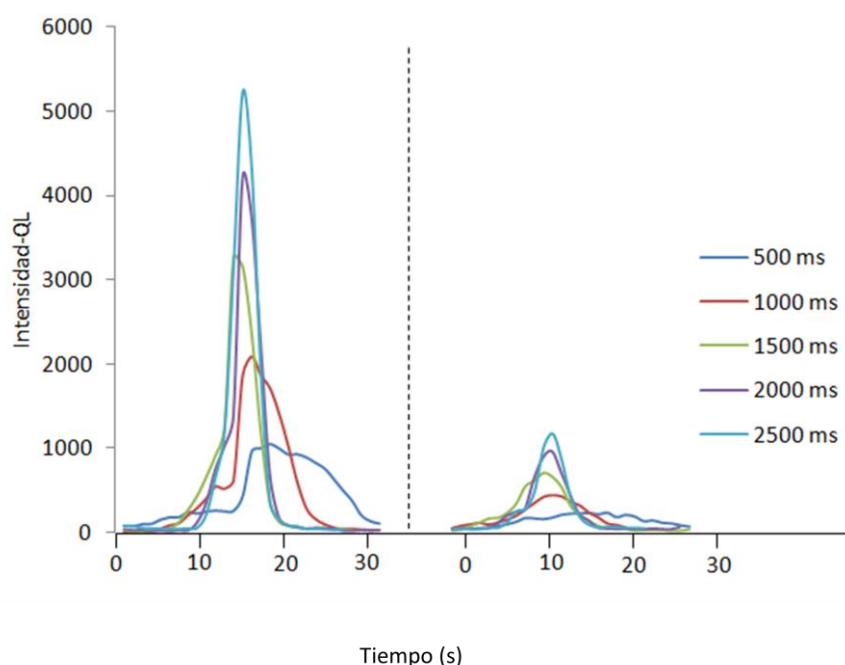


Figura 107. Influencia del tiempo de integración para 10 mg L⁻¹ de IAA e IBA.

Los mejores resultados, para ambos pesticidas en todo el intervalo de concentraciones, se obtuvieron para un tiempo de integración de 2.500 ms, donde se obtuvo la señal analítica más alta y la forma de pico más simétrica. La intensidad de quimioluminiscencia resultó ser proporcional al tiempo de integración, lo cual podría explicarse considerando que la oxidación del pesticida se produce de forma

instantánea al mezclarse con el oxidante, y que el producto quimioluminiscente resulta ser estable, al menos, durante el tiempo de residencia en el montaje de flujo (aproximadamente 15 segundos).

7.4.3. Optimización de parámetros de flujo

La optimización se llevó a cabo utilizando ambos pesticidas a tres concentraciones diferentes (1, 10, 30 mg L⁻¹). Los parámetros de flujo que se estudiaron fueron la frecuencia de pulsos (tiempo ON/OFF de las bombas solenoides) y el número de pulsos de las bombas del oxidante y del pesticida.

7.4.3.1. Optimización de la frecuencia de pulsos de las bombas solenoides

Éste parámetro determina el caudal de flujo del sistema, así como, el patrón de mezclado de las disoluciones de pesticida y oxidante.

Se probaron tres secuencias diferentes ((0.2,0.2), (0.3,0.3) y (0.4,0.4)), para las tres concentraciones de pesticida. Los mejores resultados (pico mas alto y más reproducible) para el pesticida IAA, se obtuvieron para una frecuencia de pulso de la bomba de (0.3,0.3), y para IBA de (0.2,0.2).

En la figura 108 se representan los resultados para ambos pesticidas. Como se observa en la miniatura de la figura (IBA, 1 mg L⁻¹), la forma del pico se ve afectada por este parámetro, ya que, a medida que se alarga el tiempo entre pulsos (0.3,0.3) y (0.4,0.4), aparece un hombro a la izquierda del pico; esto indica que el frente de pesticida empieza a reaccionar con la cola de exceso de oxidante del ciclo anterior. Por

el contrario, al acortar el tiempo del ciclo de la bomba se llena mas rápidamente la celda en espiral, empujando la cola de oxidante del ciclo anterior y acortando el hombro del pico.

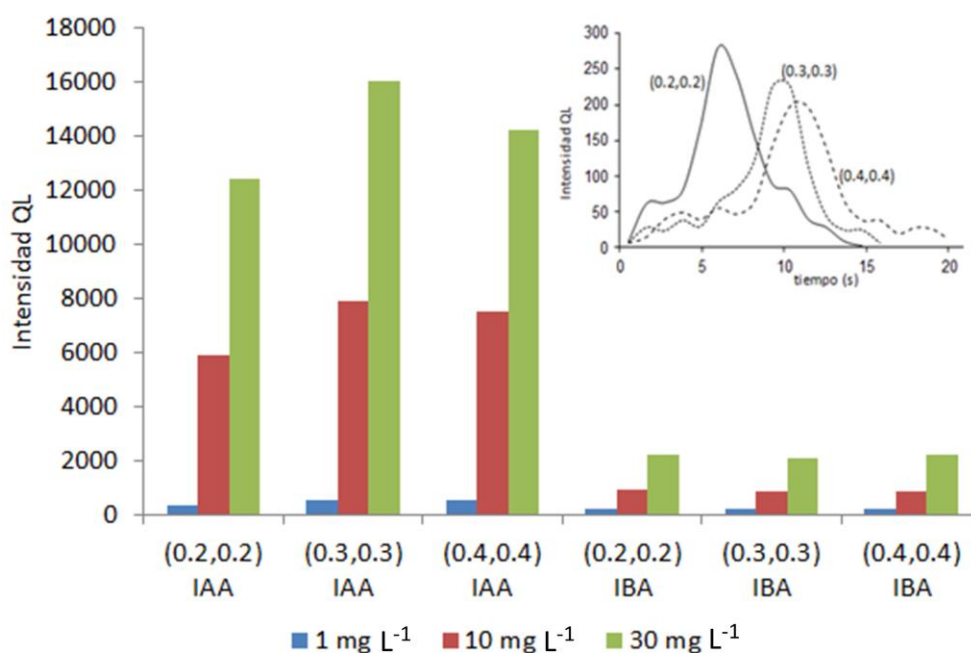


Figura 108. Influencia de la frecuencia de pulsos.

7.4.3.2. Optimización del número de inserciones de pesticida

La optimización del número de inserciones de pesticida es importante porque de ello depende la cantidad de pesticida introducido en el sistema de flujo. La optimización se realizó con las condiciones obtenidas hasta el momento. Tiempo de integración de 2500 ms para ambos pesticidas y la frecuencia de inserción de (0.3,0.3) para IAA y (0.2,0.2) para IBA.

Se optimizaron el número de inserciones de pesticida para cada sistema oxidante, con 1 y 10 mg L⁻¹ IAA e IBA.

Como se observa en las figuras 109 y 110, a medida que aumenta el número de inserciones (pulsos) se retrasa la aparición del pico. Una muestra de la eficiencia de mezclado al emplear un flujo pulsante proporcionado por bombas solenoides se observa en la ausencia de doubles picos incluso cuando se insertan volúmenes relativamente grandes de pesticida (360 μL equivalentes a 45 pulsos). Se observa la aparición de un hombro, debido a que la inserción del pesticida introducido más lentamente con la bomba de 8 μL reacciona con la cola de oxidante del ciclo anterior. Para ambos pesticidas se seleccionaron 25 inserciones, que aunque no corresponde a la señal analítica mas alta (IAA experimenta una reducción de 11,9% en la altura de pico respecto a la señal para 40 pulsos) permite una eliminación casi total del hombro del pico y una reducción de 5 segundos, (de 15 a 10 segundos en la obtención del pico desde el inicio de la inserción del pesticida hasta que se restituye la línea base).

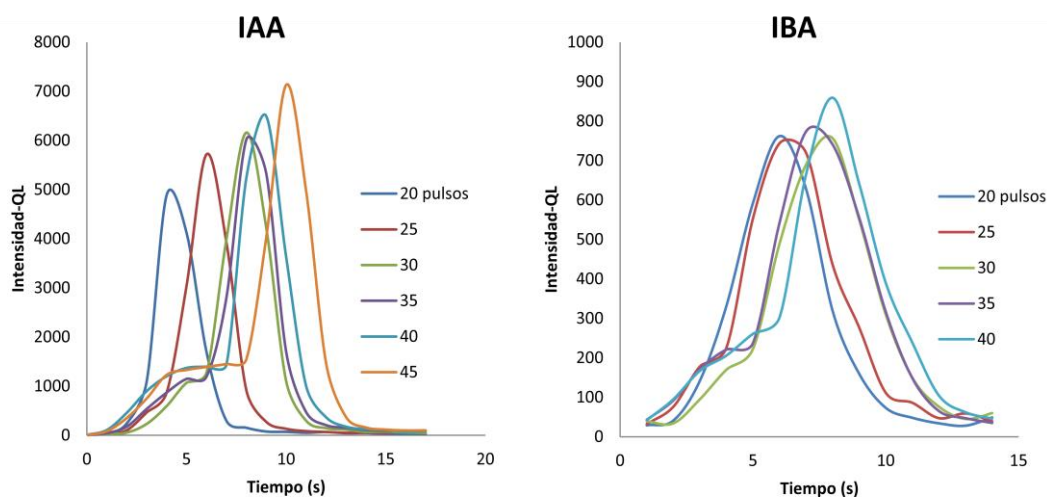


Figura 109. Optimización del número de pulsos de pesticida para 10 mgL^{-1} de IAA e IBA.

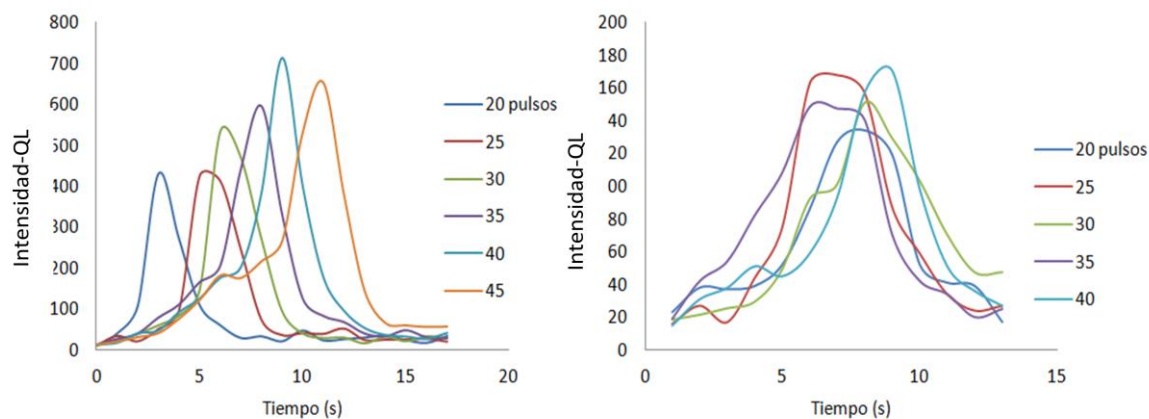


Figura 110. Optimización del número de pulsos de pesticida para 1 mg L^{-1} de IAA e IBA.

7.4.3.3. Optimización del número de inserciones del sistema oxidante

Se estudió la posible influencia del número de inserciones del sistema oxidante. Las experiencias se realizaron con cada pesticida. Se empleó para el estudio una concentración de pesticida de 1 mg L^{-1} .

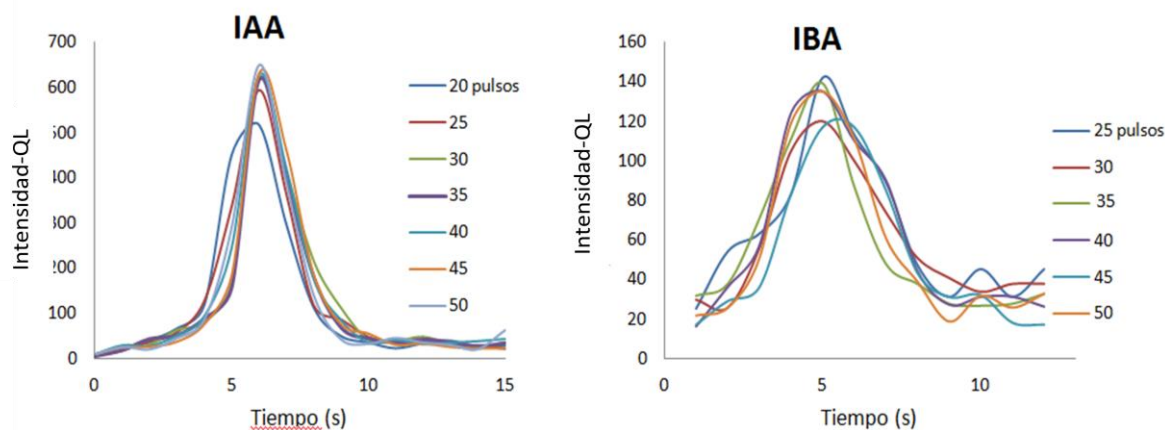


Figura 111. Optimización del número de pulsos de oxidante para 1 mg L^{-1} de IAA e IBA.

De estas experiencias, como se puede observar en la figura 111, para el IAA con sistema oxidante, $\text{KMnO}_4/\text{H}_2\text{SO}_4$, no se aprecian diferencias tanto en la forma como en

la altura del pico para un número de pulsos superior a 25; se seleccionaron 30 inserciones de oxidante ya que el mezclado es efectivo y la reacción con el pesticida es completa. Para el IBA con el sistema oxidante $K_3Fe(CN)_6/NaOH$, no se apreciaron diferencias significativas en el número de inserciones; sin embargo, es necesario un número de pulsos elevado para recuperar la línea base. Se seleccionaron 50 pulsos para el cual se obtuvo un pico bastante simétrico que no presenta hombro.

7.5. Estudio del sistema oxidante

Se estudian diferentes concentraciones para cada sistema oxidante, tanto del reactivo oxidante como del medio en que fue preparado. En el proceso de optimización de ambos sistemas oxidantes se emplearon disoluciones acuosas de pesticida de 1 y 10 mg L⁻¹.

7.5.1. Estudio del sistema oxidante $KMnO_4/H_2SO_4$ para IAA

Se optimizó en primer lugar la concentración de $KMnO_4$ en el intervalo de concentraciones comprendido entre 10^{-4} mol L⁻¹ y $1,4 \cdot 10^{-2}$ mol L⁻¹. Una vez seleccionada la concentración de $KMnO_4$, se optimizó la concentración de H_2SO_4 , en un intervalo de concentraciones de 0,5 mol L⁻¹ a 2,5 mol L⁻¹.

Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 112 y 113. Se observó que conforme aumentaba la concentración de $KMnO_4$ aumentaba también la señal analítica hasta un máximo en $5 \cdot 10^{-4}$ mol L⁻¹, disminuyendo con el aumento de la concentración. El comportamiento fue idéntico para 1 mg L⁻¹, por lo que se seleccionó

como concentración óptima KMnO_4 $5 \cdot 10^{-4}$ mol L^{-1} . La disminución observada a concentraciones superiores es atribuible a la autoabsorción de radiación por parte del propio oxidante, que presenta una intensa coloración.

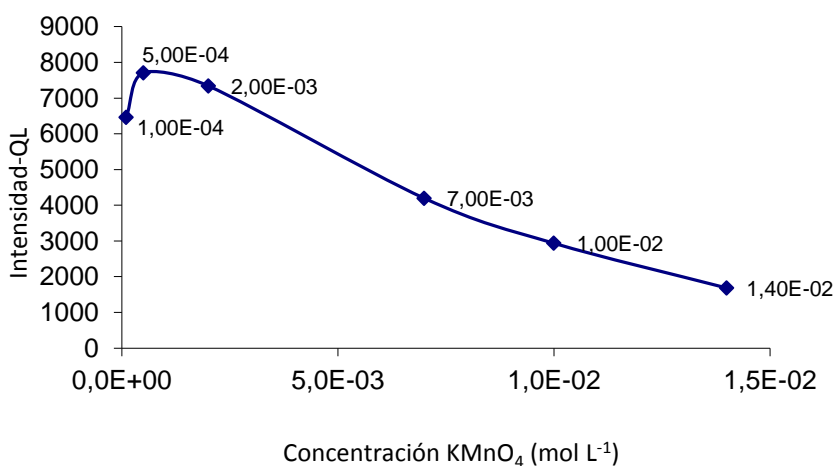


Figura 112. Optimización de la concentración de KMnO_4 para IAA (10 mg L^{-1}).

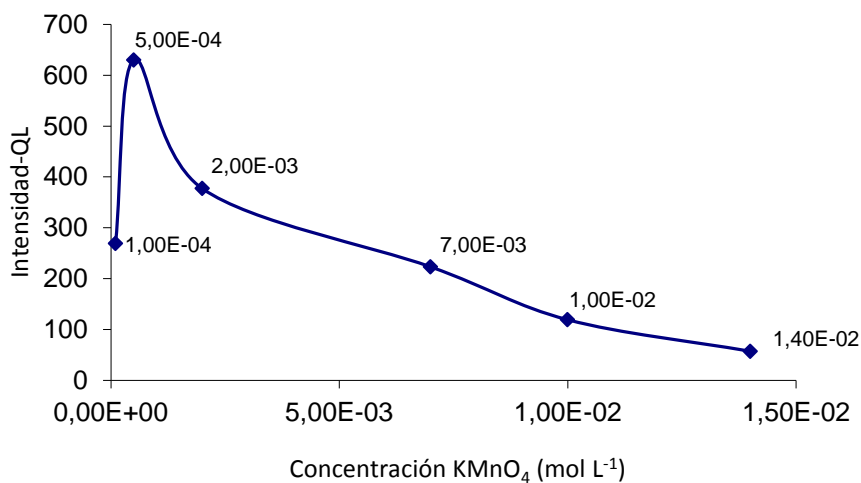


Figura 113. Optimización de la concentración de KMnO_4 para IAA (1 mg L^{-1}).

Una vez fijada la concentración de KMnO_4 , se optimizó la concentración de H_2SO_4 , los resultados se representan en la figura 114.

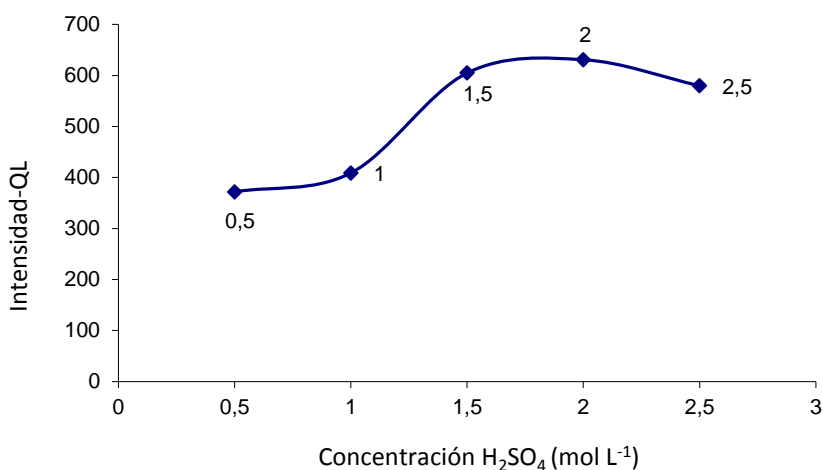


Figura 114. Optimización de la concentración de H_2SO_4 para IAA (1 mg L^{-1}).

Se observa, que a medida que aumentó la concentración de H_2SO_4 , aumentó también la señal analítica, hasta una pequeña meseta comprendida entre $1,5 \text{ mol L}^{-1}$ y 2 mol L^{-1} , donde a partir de 2 mol L^{-1} comienza a disminuir la señal. La concentración de H_2SO_4 seleccionada fue de 2 mol L^{-1} .

7.5.2. Estudio del sistema oxidante $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{NaOH}$ para IBA

En primer lugar, se optimizó la concentración de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, en el intervalo de concentración comprendido entre $5 \cdot 10^{-4}$ y $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Una vez seleccionada esta concentración se optimizó la concentración de NaOH , en un intervalo entre $1,5 - 9 \text{ mol L}^{-1}$.

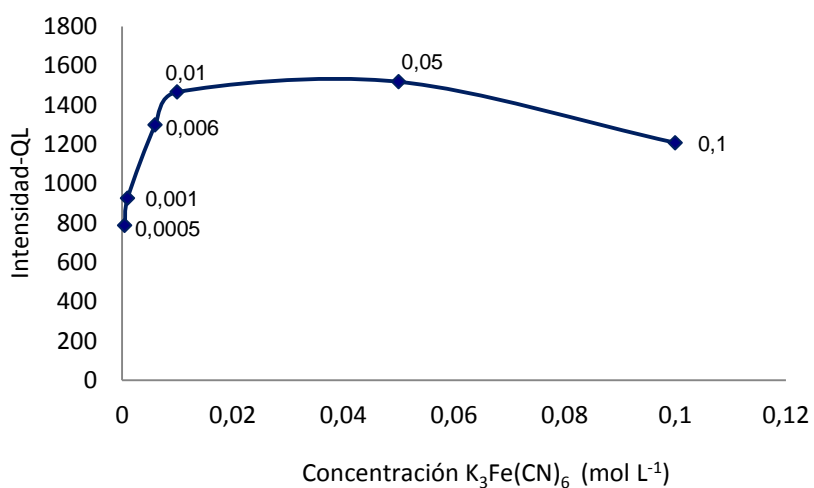


Figura 115. Optimización de la concentración de $K_3Fe(CN)_6$ para IBA (10 mg L⁻¹).

Como se observa en la figura 115, con el aumento de la concentración se incrementó la señal analítica hasta una concentración 0,01 mol L⁻¹, observándose una meseta entre 0,01 y 0,05 mol L⁻¹, para posteriormente disminuir ligeramente para concentraciones mayores.

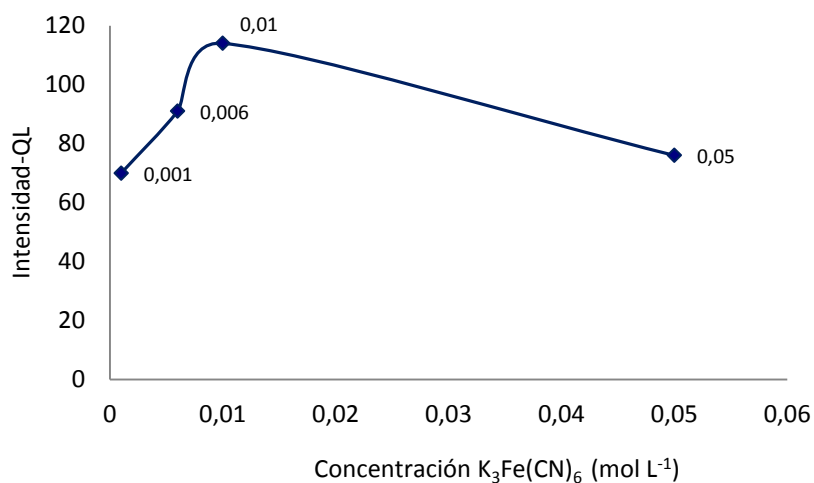


Figura 116. Optimización de la concentración de $K_3Fe(CN)_6$ para IBA (1 mg L⁻¹).

Dado el comportamiento del sistema para las bajas concentraciones (1 mg L^{-1}), se seleccionó finalmente una concentración de $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$.

Una vez fijada la concentración $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, se optimizó la concentración de NaOH para una concentración de 10 mg L^{-1} , los resultados se representan en la figura 117.

Se observó un incremento significativo de la intensidad de quimioluminiscencia con el aumento de la concentración de NaOH (aproximadamente aumenta la señal analítica aumentó 5 veces al pasar de una concentración de 2 mol L^{-1} a 7 mol L^{-1} ; sin embargo, aparecen picos con cola y el retorno a la línea base se prolonga de forma importante para concentraciones mayores o igual a 5 mol L^{-1} . Por ello, se seleccionó la concentración de 4 mol L^{-1} para el NaOH.

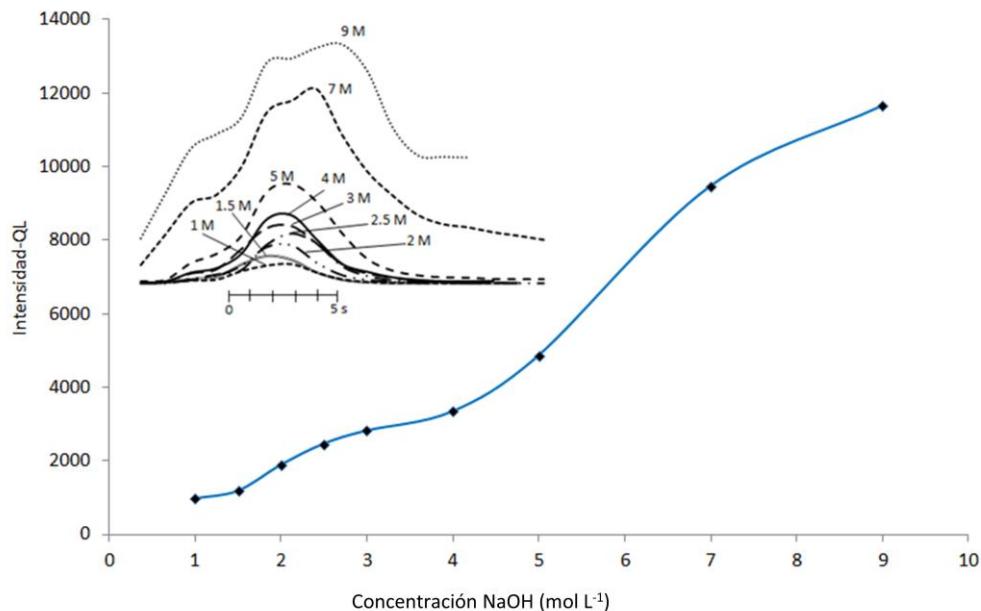


Figura 117. Influencia de la concentración de NaOH en el sistema oxidante $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, (10 mg L^{-1} IBA).

7.6. Estudio de sensibilizadores

En las reacciones quimioluminiscentes algunas especies químicas actúan como aceptores de energía, en la reacción no siempre es el producto es quien emite luz, sino que transfiere su energía al sensibilizador que al volver a su estado fundamental es el responsable de la emisión final.

Los siguientes compuestos, habitualmente empleados en quimioluminiscencia como sensibilizadores o potenciadores de QL fueron ensayados: SDS 0.015%, quinina $6 \cdot 10^{-5}$ M, triton-X 0.1%, hexadecilpiridinio $5 \cdot 10^{-4}$ mol L⁻¹, acetona 0.25%, acetona-acetonitrilo 0.5%, acetonitrilo 1%, dimetilformamida 2%, THF 5%, Cu⁺² $5 \cdot 10^{-5}$ mol L⁻¹, β-ciclodextrinas 10^{-5} mol L⁻¹, 1,4-dioxano 5%, ácido fórmico 0.5%, etanol 0.1%, rodamina B $5 \cdot 10^{-4}$ mol L⁻¹ y rodamina 6-G $5 \cdot 10^{-4}$ mol L⁻¹.

7.6.1. Adaptación del montaje para el estudio de sensibilizadores

Para la realización de esta experiencia se modificó el montaje empleado en los ensayos previos (figura 103). En el montaje se modificó el canal por donde se introduce el pesticida: la línea Q1 de pesticida se desdobló en dos líneas (disolución de pesticida y sensibilizador), cada una de ellas impulsada por bombas de 8 μL, una segunda válvula solenoide V2, fue la responsable de introducir en el sistema de flujo la disolución resultante de la mezcla del pesticida y del sensibilizador. La experiencia se llevó a cabo con una secuencia de inserción en la que se intercalaron segmentos de pesticida y sensibilizador en las mismas proporciones. Finalmente la mezcla resultante se introdujo por V1(ON) para su posteriormente mezcla con el sistema oxidante. La señal

del blanco para el pesticida se obtuvo introduciendo por el canal del pesticida agua desionizada.

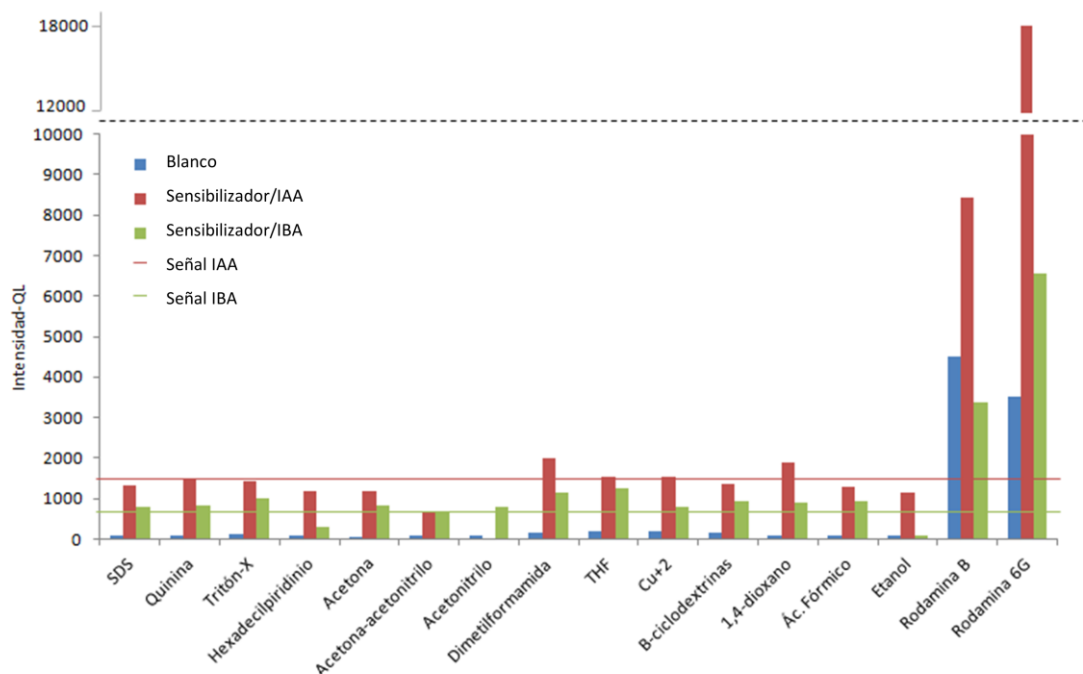


Figura 118. Estudio de sensibilizadores para IAA e IBA (5 mg L⁻¹).

En general, los sensibilizadores y potenciadores de QL estudiados no causaron una exaltación de la señal de quimioluminiscencia, los valores excepcionalmente altos observados para la rodamina B y 6G son debidos a las elevadas señales del blanco.

Los valores óptimos de los parámetros químicos y de flujo empleados en el estudio de las características analíticas del método se resumen en tabla 25:

	IAA	IBA
Secuencias de inserción	P1 = 25*(0.3,0.3) V = 15,18 P2 = 15,30*(0.3,0.3),0.1	P1 = 25*(0.2,0.2) V = 10,20 P2 = 10,50*(0.2,0.2),0.1
Condiciones químicas del sistema oxidante	KMnO ₄ (5·10 ⁻⁴ mol L ⁻¹)/ H ₂ SO ₄ (2 mol L ⁻¹)	K ₃ Fe(CN) ₆ (10 ⁻² mol L ⁻¹)/ NaOH (2 mol L ⁻¹)

	IAA	IBA
Tiempo de integración	2500 ms	2500 ms
Frecuencia de inserción	(0.3,0.3)	(0.2,0.2)

Tabla 25. Valores óptimos de los parámetros optimizados.

7.7 Aplicaciones analíticas del método

Para estudiar las características analíticas del método se realizaron calibrados en días diferentes con disoluciones recién preparadas y se estudió la reproducibilidad, repetitividad y límites de detección. Los resultados se muestran a continuación (tabla 26):

	IAA	IBA
Ecuación (C en mg L ⁻¹)	$I_{QL} = 592.7 C + 143.1$ ($r^2 = 0.993$)	$I_{QL} = 299.4 C + 200.2$ ($r^2 = 0.992$)
Rango de linealidad ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0.05-10	0.08-10
Reproducibilidad RSD (%)	3.2	2.0
Limite de detección ($\mu\text{g mL}^{-1}$) teórico/experimental	0.05/0.05	0.08/0.07
Repetitividad (0,5/5 mg L ⁻¹) RSD(%) (n=20)	5.6/2.7	7.5/3.4
Velocidad de muestreo (h ⁻¹)	109	120

Tabla 26. Características analíticas del método.

La reproducibilidad se obtuvo como la desviación estándar relativa de las pendientes correspondientes a 5 calibrados obtenidos en días distintos, empleando disoluciones de reactivos y pesticida recién preparadas.

La repetitividad se calculó para dos concentraciones diferentes de pesticida (0,5 y 5 mg L⁻¹) y una serie de 20 picos.

El límite de detección se determinó experimentalmente disminuyendo la concentración de auxina hasta que la señal se hizo prácticamente indistinguible de la línea base; y teóricamente, como tres veces la desviación estándar de la línea base dividido por la pendiente de la recta de calibrado.

A continuación, se muestran en las figuras 119 y 120, un fiagrama correspondiente al calibrado para ambas auxinas.

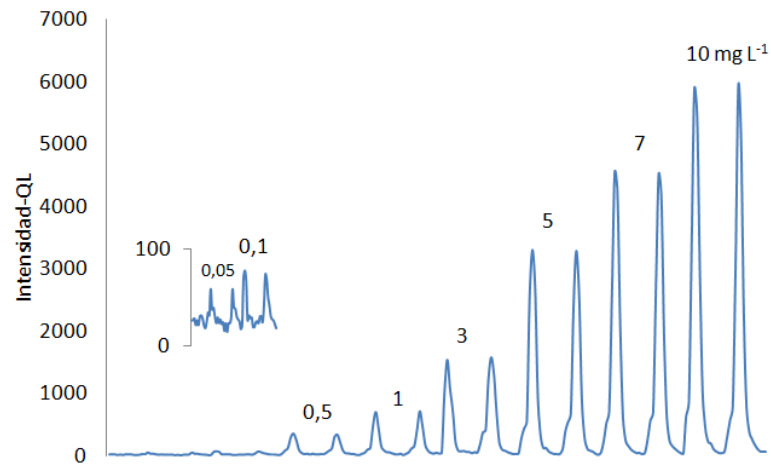


Figura 119. Fiagrama para el calibrado de IAA.

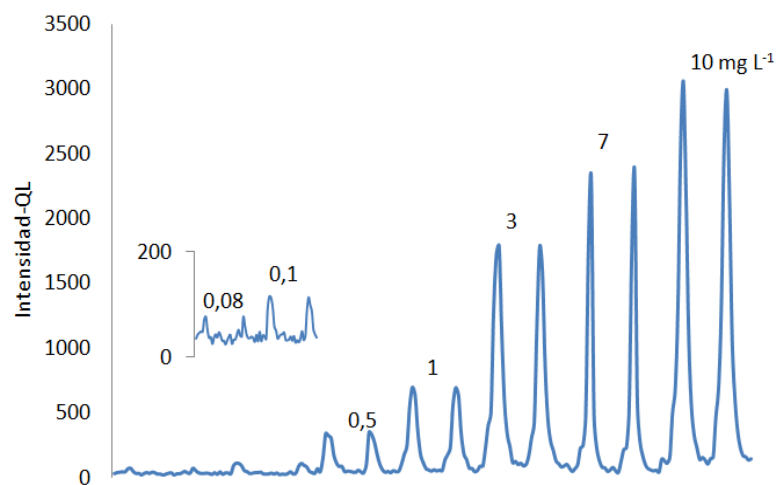


Figura 120. Fiagrama para calibrado de IBA.

7.7.1. Estudio de interferentes

Para el estudio de interferentes con el montaje propuesto, se introdujo por el mismo canal el pesticida con el interferente objeto de estudio.

Las señales fueron comparadas con las proporcionadas por una disolución patrón de 2 mg L⁻¹ de pesticida. Se prepararon para cada interferente una disolución madre de 5000 mg L⁻¹ de cada ión en forma de sal, realizando diluciones de la misma hasta que la señal obtenida diferió un ± 5% de la obtenida para la disolución patrón del pesticida. Los resultados para cada pesticida se muestran en la tabla 27.

Interferente	IAA mg L⁻¹ (error relativo %)	IBA mg L⁻¹ (error relativo %)
Na⁺	650 (-1.9)	1000 (-0.7)
K⁺	1000 (-2.5)	1000 (+1.4)
NH₄⁺	1000 (-2.5)	10 (+2.6)
Ca⁺²	1000 (-0.5)	100 (+2.3)
Mg⁺²	500 (+3.1)	10 (+2.0)
Ni⁺²	100 (+4.6)	10 (+2.0)
Cu⁺²	500 (+3.2)	10 (+1.5)
Zn⁺²	500 (+1.3)	1000 (+3.1)
Cl⁻	1000 (-1.9)	1500 (-0.7)
SO₄⁻²	1000 (-4.0)	1000 (+1.4)
CH₃COO⁻	1000 (-2.8)	1 (+3.4)
HCO₃⁻	1000 (-1.0)	1000 (+1.4)
NO₃⁻	1000 (-1.9)	1000 (+5.0)
NO₂⁻	10 (+2.6)	0.01 (-0.3)
H₂PO₄⁻	1000 (-1.1)	1000 (+1.7)

Tabla 27. Estudio de interferentes para auxinas.

En general, ambos pesticidas presentaron buena tolerancia a compuestos inorgánicos e iones. No se observaron diferencias para K^+ , SO_4^{2-} , HCO_3^- , NO_3^- , $H_2PO_4^-$, a pesar de que las concentraciones estudiadas de estos interferentes fueron 500 veces mayores que las del pesticida. Pese a que ambos métodos hacen uso de oxidantes fuertes, presentan una excelente tolerancia a Cl^- . El $KMnO_4$ utilizado para la determinación de IAA es mucho más selectivo para cationes divalentes (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+}), NH_4^+ y aniones (CH_3COO^- y NO_2^-) que el $K_3Fe(CN)_6$ utilizado en la determinación de IBA.

7.7.2. Muestras reales

El método propuesto se aplicó a la determinación de IAA e IBA en formulaciones comerciales y agua potable.

7.7.2.1 Determinación de IAA e IBA en muestras reales

- Muestra (a): *Flower, hormonas enraizantes líquidas, Productos flowers S.A.* Tárrega, Lleida, España. Esta formulación contiene un concentrado soluble de (IBA 0.4%) con etanol y ácido isopropílico. 1,25 mL de esta disolución fué llevada a 100 mL con agua desionizada. La disolución resultante se diluyó con agua desionizada hasta obtener sendas disoluciones que contienen 1 y 5 $mg L^{-1}$ de IBA.
- Muestra (b): Rhizopon A (IAA 1%) de PROJAR S.A., Quart de Poblet, Valencia, España. Una cantidad apropiada de Rhizopon A fué pesada y llevada a 10 mL con agua desionizada hasta obtener una concentración de 50 $mg L^{-1}$; la

disolución resultante, debido a la turbidez, fué filtrada con filtro Sartorius, Minisart® de 0.45 µm de tamaño de poro. De esta disolución se prepararon otras dos disoluciones de 1 y 5 mg L⁻¹.

- Muestra (c) *Rhizopon AA (IBA 8%) de PROJAR S.A.*, Quart de Poblet, Valencia, España. Una cantidad apropiada de Rhizopon AA fué pesada y llevada a 10 mL con agua desionizada hasta obtener una concentración de 50 mg L⁻¹; la disolución resultante, debido a la turbidez, fué filtrada con filtro Sartorius, Minisart® de 0.45 µm de tamaño de poro. De esta disolución se prepararon otras dos disoluciones de 1 y 5 mg L⁻¹.
- Muestra (d): Agua potable de Moncada, Valencia, España. Las muestras se prepararon dopando con disoluciones patrón de los pesticidas hasta obtener disoluciones de 5 ml L⁻¹ de IAA e IBA.

Compuesto	Concentración preparada (µg mL ⁻¹)	Concentración encontrada ¹ (µg mL ⁻¹)	Concentración declarada (%)	Concentración encontrada (%)	Error (%)
Rhizopon A	1	0.99	1	0.99	-1.0
	5	4.86	1	0.97	-3.0
Rhizopon AA	1	1.04	8	8.32	+4.0
	5	5.20	8	8.32	+4.0
Hormonas enraizantes	1	1.02	0.4	0.408	+2.0
	5	5.18	0.4	0.414	+3.6
Agua potable			Concentración añadida (µg mL⁻¹)	Concentración encontrada¹ (µg mL⁻¹)	Error (%)
IAA			5	5.20	+4.0
IBA			5	5.35	+7.0

¹ Concentración interpolada en la ecuación del calibrado.

Tabla 28. Resultado de la aplicación del método a muestras reales.

A la vista de los resultados obtenidos, los métodos propuestos resultan ser adecuados para la determinación de IAA e IBA en formulaciones comerciales y en agua potable.

7.8. Conclusiones

- Se han desarrollado sendos métodos analíticos basados en QL directa para la determinación de IAA e IBA, que presenta límites de detección de 50 ng mL^{-1} y 70 ng mL^{-1} para IAA e IBA, respectivamente.

- El sistema de flujo utilizado en la determinación QL de IAA e IBA utiliza una combinación de dos metodologías de flujo como son: la multiconmutación y el multibombeo, lo cual permite el desarrollo de un montaje sencillo, con un alto grado de automatización, rápido y económico. Dado además el bajo consumo de energía de los componentes del sistema, se puede pensar en el diseño, en un futuro próximo, de montajes portátiles para el análisis *in situ* con detección quimioluminiscente (*field instrumentation*).

- El tándem multiconmutación-multibombeo permite una automatización más simple y más eficiente que la obtenida en los sistemas de flujo FIA (las características hidrodinámicas del sistema de flujo se pueden controlar fácilmente a través del software por la activación independiente de los micro-dispositivos solenoides).

- Las microbombas solenoides actúan como sistemas inyectoros de muestra y de reactivos, y también como unidades de propulsión para las disoluciones insertadas en

sistema de flujo. Por otra parte, el flujo pulsante facilita una mezcla rápida y efectiva de la muestra/reactivo, sin afectar a la reproducibilidad, lo cual es importante en las reacciones de cinéticas rápidas como las que habitualmente se emplean en los métodos quimioluminescentes.

CONCLUSIONES FINALES

1ª) Se ha abordado el estudio de la QL-fotoinducida de pesticidas frente al KMnO_4 como oxidante. El fotorreactor, constituido por un tubo de PTFE de 0,8 mm de diámetro interno y 1.6 mm diámetro externo enrollado helicoidalmente alrededor de una lámpara de Hg de baja presión y 20 W de potencia, se incorporó a un montaje de flujo continuo basado en la metodología de multiconmutación, permitiendo llevar a cabo un *high-throughput screening* de 163 pesticidas pertenecientes a distintos grupos químicos para 5 medios de fotoirradiación distintos y con un tiempo de fotoirradiación (*stopped flow*) de tan solo 150 s.

De los pesticidas ensayados, no se hallaron estudios previos sobre QL para el 67.5% de los pesticidas, entre ellos, 76 pesticidas (47%) no presentaron QL nativa (lámpara OFF), pero sí QL fotoinducida (lámpara ON). También se observó un aumento en la intensidad de QL en un 11% de pesticidas con QL nativa, que tampoco aparecen reconocidos en la bibliografía como quimioluminiscentes. Estos resultados muestran que la QL fotoinducida puede constituir una excelente estrategia analítica, bien para incrementar la sensibilidad de especies químicas con QL nativa, o lo que resulta más interesante desde el punto de vista analítico, para poder desarrollar nuevos métodos de determinación de pesticidas que no presentan QL nativa, aprovechando las bondades analíticas de la QL: bajos LOD, alta sensibilidad, sencillez, etc.

2ª) La multiconmutación empleada en el *screening* de pesticidas se ha mostrado como una estrategia de flujo continuo de gran versatilidad, permitiendo una manipulación de las disoluciones de muestra y reactivos con una precisión de décimas de segundo (*time-pulse-counting strategy*). La versatilidad permite desarrollar

montajes de flujo más complejos que en FIA, mediante una reconfiguración lógica (*via software*), sin modificar la arquitectura física del sistema de flujo: la reconfiguración del mismo se puede llevar a cabo mucho más fácilmente reprogramando la duración de los impulsos eléctricos que controlan la apertura y cierre de las válvulas, o bien, la secuencia de conmutación de las mismas.

Además, el alto rendimiento de los sistemas de multiconmutación permite la obtención de una gran cantidad de información para alimentar modelos matemáticos de predicción basados en la relación de estructura-reactividad.

3ª) Se ha aplicado la conectividad molecular a la predicción de la QL-fotoinducida de pesticidas de que presentan una gran variedad de estructuras químicas. Se trata de una propiedad compleja, puesto que combina la susceptibilidad frente a la fotodegradación con luz UV con la respuesta quimioluminiscente con KMnO_4 como oxidante fuerte (QL directa).

De los resultados obtenidos se desprende una excelente correlación entre los resultados experimentales y los valores de probabilidad y de la Función Discriminante obtenidos en el desarrollo del modelo de conectividad. En el grupo de entrenamiento se observó un porcentaje de coincidencia entre la clasificación teórica y experimental del 90 y 95,5% para el grupo de activos e inactivos respectivamente. Por otra parte, para el grupo de prueba o test, estos porcentajes fueron del 100% y del 90% para los pesticidas clasificados como activos e inactivos respectivamente.

4ª) Se ha desarrollado un método completamente automatizado basado en la metodología de flujo de multiconmutación y la QL-fotoinducida para la determinación de imidazolinonas en aguas potables y minerales. Imazapir, imazaquín e imazametabenz-metil, los cuales no presentan QL-nativa (lámpara OFF), se transforman en compuestos fuertemente quimioluminiscentes tras 270 s de fotoirradiación en presencia de KMnO_4 como oxidante.

El método es lineal hasta 10 mg L^{-1} para los tres pesticidas; los límites de detección y la repetibilidad (expresada como la dsr de 10 picos de una disolución de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de pesticida) son: $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ y 1,3% (imazapir), $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ y 2,2% (imazaquín), y $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ y 1,4% (imazametabenz-metil). La frecuencia de muestreo fue en todos los casos de 12 h^{-1} .

5ª) Se han desarrollado sendos métodos analíticos automatizados basados en QL directa para la determinación de auxinas, concretamente para el ácido 3-indolil-acético (IAA) y el ácido 3-indolil butírico (IBA). El método se basa en la QL directa originada por la oxidación de IAA e IBA con KMnO_4 y $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, respectivamente.

La automatización del sistema de flujo se basa en el tándem multiconmutación-multibombeo, que permite el desarrollo de un montaje sencillo, con un alto grado de automatización, rápido y económico. El multibombeo (*multi-pumping*) emplea microbombas solenoides que actúan como sistemas inyectoros de muestra y de reactivos, y también como unidades de propulsión para las disoluciones insertadas en el sistema de flujo. El flujo pulsante facilita una mezcla rápida y efectiva de la

muestra/reactivo, sin afectar a la reproducibilidad, lo cual es importante en las reacciones de cinéticas rápidas como las que habitualmente se emplean en los métodos QL.

Ambas auxinas presentan un comportamiento lineal hasta $10 \mu \text{L}^{-1}$; con límites de detección de 50 ng mL^{-1} y 70 ng mL^{-1} para IAA e IBA, respectivamente. La frecuencia de muestreo es de 109 h^{-1} (IAA) y 120 h^{-1} (IBA). El método se ha aplicado con éxito para la determinación de IAA e IBA en formulaciones técnicas y agua potable

6ª) Si bien no es habitual incluir entre las conclusiones finales la proyección futura de los resultados de la investigación derivados de un proyecto de tesis doctoral finalizado, se considera oportuno en esta última sección realizar algunos comentarios sobre lo que podríamos denominar la “*deriva de la investigación*”; es decir, hacia qué otras líneas de investigación se encamina, cuál puede ser la evolución “natural” o hacia dónde podría dirigirse la investigación modulada por los resultados obtenidos. La investigación llevada a cabo se orienta hacia la minoración de la escala de trabajo (miniaturización de los sistemas de flujo), lo cual implica la reducción física del detector (introducción de fibra óptica, micro-PMTs) y de los sistemas de flujo (micro-chips, nano-bombas); en definitiva, introducirse en el campo de la *Tecnología Microfluídica*.

Otra deriva natural posiblemente más inmediata, sea el *acoplamiento con HPLC en detección post-columna* de los sistemas de flujo desarrollados. Ello permitiría abordar el análisis de matrices más complejas (análisis biomédico), e incluso ampliar el ámbito de aplicación al análisis multiresiduos de pesticidas.

Finalmente, el proyecto también engloba una vertiente tecnológica. Los controladores de dispositivos solenoide y el software correspondiente podrían en un futuro a medio plazo, convertirse en un objetivo de la investigación, cuyos resultados podrían concretarse en algún modelo de utilidad o patente. Directamente conectado con esta deriva se encontraría plantearse la explotación comercial y transferencia tecnológica de los resultados de la investigación a través de la creación de una empresa de base tecnológica en el marco universitario (*spin-off* universitaria).

***ARTÍCULOS PUBLICADOS
RELACIONADOS CON LA
TESIS DOCTORAL***



Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

Talanta 72 (2007) 378–386

Talanta

www.elsevier.com/locate/talanta

Theoretical prediction of the photoinduced chemiluminescence of pesticides

I. Sahuquillo Ricart^a, G.M. Antón-Fos^{a,*}, M.J. Duart^b, J.V. García Mateo^{a,*},
L. Lahuerta Zamora^a, J. Martínez Calatayud^c

^a Departamento de Química, Bioquímica y Biología Molecular,
Universidad Cardenal Herrera-CEU, Moncada, Valencia, Spain

^b Departamento de Ingeniería, División de Farmacia y Tecnología Farmacéutica,
Facultad de Farmacia, Universidad Miguel Hernández, Alicante, Spain

^c Departamento de Química Analítica, Universidad de Valencia, Valencia, Spain

Received 3 May 2006; received in revised form 10 October 2006; accepted 20 October 2006

Available online 8 December 2006

Abstract

Although it is relatively easy to find chemiluminescent (CL) molecules working on the field of direct liquid phase (especially employing strong oxidants), the molecules found as chemiluminescent are normally very weak CL compounds for developing suitable analytical CL-procedures. Therefore, it is mandatory to develop new strategies to enhance in a simple way the native chemiluminescence of such a compounds, and even to increase the number of compounds to be determined by direct chemiluminescence. Photoinduced chemiluminescence (Ph-CL) results in a simple and easily on-line accessible strategy to solve these disadvantages. In the present paper, molecular connectivity, a topological method which allows an unique mathematical characterization of molecular structures by the so-named topological descriptors and their correlation with physical, chemical and biological properties of molecules was applied to predict the Ph-CL in liquid phase. Molecular connectivity calculations and discriminant analysis was applied to 72 pesticides for which either a Ph-CL or non Ph-CL behaviour was observed in an experimental screening. The screening test is based on the on-line photodegradation of pesticides by using an automated multicommutation based flow assembly provided with a photoreactor consisting of 150 cm × 0.8 mm PTFE tubing helically coiled around a 20 W low-pressure mercury lamp. Photodegraded pesticides are detected by direct chemiluminescence of the resulting photo-fragments and their subsequent reaction with potassium permanganate in sulfuric acid medium as oxidant. The screening comprised pesticides with different molecular structures and relevant members of the most important families of pesticides were tested (oxime carbamates, sulfonylecarbamates, thiocarbamates, 1,3,5-triazines, organophosphorous, hydroxybenzotriazole, sulfonyleureas, phosphonic acid derivatives, imidazolinones, carboxamides, aryloxyalkanoic acids, 1,2,4-triazinones, etc.). The theoretical predictions agree with the empirical results obtained by means of the screening test performed in the multicommutation flow-assembly.
© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Pesticides; Multicommutation; Molecular connectivity; Chemiluminescence; Photodegradation

1. Introduction

Chemiluminescence research is in continuous expansion by virtue of the search on new processes allowing the direct chemiluminescence-based determination of substances of pharmaceutical, clinical or environmental interest [1,2]. In this sense, direct chemiluminescence methods based on strong oxidant such

as potassium permanganate have found a wide range of analytical applications [3,4].

Luminescence techniques for organic pesticides residue analysis have been limited by the fact that, relatively few of these compounds are strongly luminescent. This can be overcome converting the weakly luminescent pesticide into a luminescent compound by means of a chemical derivatization using fluorogenic labeling [5–7]. A more recent and relatively widely employed approach based on UV irradiation of non-fluorescent analytes into strongly fluorescent photoproducts has demonstrated the viability of photochemically induced fluorimetry in pesticide quantitative analysis [8]. On the other hand, it

* Corresponding authors. Tel.: +34 96 1369000; fax: +34 96 1395272.

E-mail addresses: ganton@uch.ceu.es (G.M. Antón-Fos),
jvgarcia@uch.ceu.es (J.V.G. Mateo).

Chemiluminescent Determination of the Pesticide Bromoxynil by On-line Photodegradation in a Flow-Injection System

Z. PAWLICOVÁ,* J. R. ALBERT-GARCÍA,* I. SAHUQUILLO,** J. V. GARCÍA MATEO,**
M. CATALÁ ICARDO,*** and J. MARTÍNEZ CALATAYUD*†

*Department of Analytical Chemistry, University of Valencia, Valencia, Spain

**Department of Chemistry, Biochemistry and Molecular Biology, University Cardenal Herrera-CEU,
Moncada, Valencia, Spain

***Department of Chemistry, Polytechnic University of Valencia, Valencia, Spain

A new, robust and simple method is proposed for the chemiluminescent determination of the pesticide Bromoxynil. The empirical procedure is performed with the aid of a flow-injection manifold provided with an on-line photo-reactor to obtain chemiluminescent photofragments. After a period of 12 s of irradiation with an 8 W low-pressure mercury lamp, a chemiluminescent oxidation was performed with the system potassium permanganate in a polyphosphoric acid medium. The photolysis required a basic medium (KOH 0.014 mol l⁻¹) with ethanol (1%) as a sensitizer. The method allowed the determination of 134 samples h⁻¹ of Bromoxynil in a wide interval of concentrations, over the range 5 × 10⁻³ - 1 mg l⁻¹; the detection limit was 5 × 10⁻³ mg l⁻¹. The RSD (n = 24) at 0.25 mg l⁻¹ of the pesticide level was 2.3%. The method was applied to a water sample and to a formulation.

(Received August 6, 2005; Accepted October 28, 2005)

Introduction

Bromoxynil (3,5-dibromo-4-hydroxybenzotrile) is a nitrile herbicide¹ that is used for the post-emergent control of annual broad-leaf weeds, especially in cereal, corn, sorghum, flax, onions, mint and non-cropland. This pesticide acts to inhibit photosynthesis in the target plants. The molecular structure is shown in Fig. 1.

Most of the reported analytical methods for the determination of Bromoxynil are chromatographic, often in tandem with mass spectrometry, with UV detection, or even a combination of both.² There are methods for the determination in atmospheric samples (gas and particles),³ crops,⁴ water,⁵⁻¹¹ from biological origins,¹² wines with a solid-phase extraction (SPE),¹³ soils,¹⁴⁻¹⁶ foodstuffs^{17,18} or plants.¹⁵ Electrochemical detection has been combined with HPLC for the determination of Bromoxynil and Ioxynil in barley.¹⁹

Two capillary electrophoresis methods^{20,21} provided with solid-phase extraction have been proposed for Bromoxynil determination in the analysis of water samples.

Although separative methods are by far the most commonly used; some attempts for direct determination have been published. Abubaker *et al.*²² proposed peroxyoxalate chemiluminescence for the determination of phenol herbicides in soil. An ester is formed by a reaction with anhydride triethylamine and oxalyl chloride in tetrahydrofuran (THF). After eliminating of the supernatant liquid phase under a vacuum, a re-dissolution in THF containing 9,10-diphenylanthracene was implemented and the injection of H₂O₂ into a standard quartz spectrophotometer cell yielded light emission, which was measured at two different

time intervals of 1 and 3 s. However, the linear range was observed for quite high concentrations, over the range of 10 - 100 mg l⁻¹.

Phosphorescence has been also used.²³ The spectra (264 and 420 nm for excitation and emission, respectively) were recorded in ether-isopentane-ethanol (5:5:2) at 77 K. A linear behavior was found in the range from 0.2 (quantitation limit) to 7.5 mg l⁻¹ of Bromoxynil. Finally, a Photosystem II-based biosensor have been proposed by Koblizek *et al.*²⁴

This present paper contributes to the non-separation methods for the Bromoxynil determination. The selected detector was a luminometer; due to direct chemiluminescence, it provides a strong oxidant and has proved to be a highly sensitive method that is applicable over a wide range of concentrations and with very low detection limits.^{25,26} To obtain the emitter product, on-line irradiation with UV light was used, as a clean reactive for derivatization. The UV irradiation proved to be an easy and clean way of derivatization to obtain fluorometric²⁷⁻²⁹ or chemiluminescent structures.³⁰⁻³² A discussion of possible photoproducts is included. In order to automate the method, a flow injection analysis (FIA) manifold was developed.

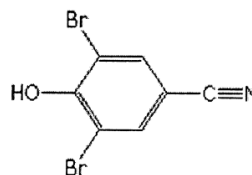


Fig. 1 Molecular structure of the herbicide Bromoxynil.

† To whom correspondence should be addressed.
E-mail: jose.martinez@uv.es

Photoinduced-Chemiluminometric Determination of Imidazolinone Pesticides in a Multi-Commutated Flow-Assembly

I. Sahuquillo Ricart and J. V. García Mateo*

Department of Pharmacy, Faculty of Health Sciences, University CEU-Cardenal Herrera 46113, Moncada, Valencia, Spain

Abstract

A fully automated method for determination of imidazolinone pesticides in tap and mineral waters is proposed. The automation of the flow assembly is based on the multi-commutation approach, which uses multiple solenoid actuated micro-solenoid devices strategically positioned in the flow manifold. The determination of imazapyr, imazaquin and imazamethabenz-methyl is performed on the basis of the photodegradation of pesticides by using a photoreactor consisting of 150 cm x 0.8 mm PTFE tubing helically coiled around a 20 W low-pressure mercury lamp. UV irradiation of imidazolinone pesticides (270s) turns into strong chemiluminescent photoproducts in presence of potassium permanganate as oxidant. The method is linear up to 10 mg L⁻¹ for all imidazolinones; the limit of detection and reproducibility (as the RSD of 10 peaks of a 0.5 mg L⁻¹ solution) are 0.05 mg L⁻¹ and 1.3 % (imazapyr), 0.1 mg L⁻¹ and 2.2 % (imazaquin), and 0.01 mg L⁻¹ and 1.4 % (imazamethabenz-methyl). The sample frequency is 12 h⁻¹.

Keywords Imidazolinone pesticides, multi-commutation, chemiluminescence, photodegradation.

1. Introduction

Imidazolinones are a relatively new class of herbicides, first appearing in 1981. They are among the most popular choices for farmers worldwide, because they are nontoxic to animals and highly selective. Imidazolinone herbicides are a potent commercial herbicides family and an essential part of the multibillion-dollar weed-control market. They are more effective against broadleaf weeds than grasses, and have both foliar and soil activity. Imidazolinones kill plants by inhibiting acetohydroxyacid synthase (AHAS), which is localized in plant meristematic tissues, and are involved in the biosynthesis of branched-chain essential amino acids valine, leucine and isoleucine. This causes a disruption of protein synthesis which in turn leads to interference in DNA syntheses and cell growth [1-3].

The basic structural requirements for the imidazolinone class of herbicides consist of an aromatic ring (pyridine, quinoline or benzene), carboxylic acid or carboxyester and an adjacent *ortho*-imidazolinone ring (Figure 1).

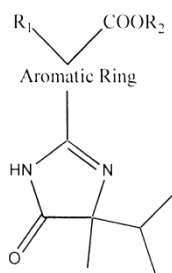


Fig. 1 Formula of imidazolinone pesticides.

In the area of environmental analysis of imidazolinones, analytical methods including HPLC with UV [4-6] and mass spectroscopy detection [7,8], HPLC separation on polysaccharide-coated chiral phases [9], GC/MS [10], and fiber optic immunosensors [11, 12] have been employed. Due to the simplicity, low cost and high sensitivity and selectivity, chemiluminescence (CL) based detection has become in the last years a quite useful detecting tool in flowing methodologies. Nevertheless, CL-techniques for organic pesticides residue analysis have been limited by the fact that, relatively few of these compounds are strongly chemiluminescent. This can be overcome by means of different analytical strategies, namely, photochemically-induced chemiluminescence (Ph-CL) [13-16].

On the other hand, the use of multiple solenoid actuated micro-solenoid devices strategically positioned in the flow manifold (multi-commutation) has led to significant attainments mainly in relation to the improvement of analytical features of flow analysis, namely, reproducibility, reduction of sample and reagents consumption, degree of automation and versatility [17]. Despite its analytical potential, multi-commutation has been applied scarcely to the quantitative analysis of pesticides [18-22].

The immediate purpose of the present work was to develop a simpler assay for determination of imidazolinone pesticides using a fully automated multi-commutation flow system coupled to Ph-CL. Photoproducts were determined by direct chemiluminescence employing potassium permanganate as oxidant. The method has been applied to the determination of imidazolinone herbicides in tap and mineral waters. The method allows on the basis of the Ph-CL approach the determination of pesticides (as imazaquin, imazapyr and imazamethabenz-methyl) which present very weak or nulle native chemiluminescence. The proposed method could be useful e.g. for post-column detection in HPLC. To the authors' knowledge, there is no references devoted to the chemiluminometric determination of imidazolinones.

*To whom correspondence should be addressed.
E-mail: jvgarcia@uch.ceu.es

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

CAPÍTULO I

Figura 1. Evolución del mercado fitosanitario mundial.....	13
Figura 2. Evolución del mercado fitosanitario en España.....	14
Figura 3. Estructura molecular del aldicarb.....	25
Figura 4. Estructura molecular del Linurón y Metsulfurón metil.....	26
Figura 5. Estructura molecular del isoproturón.....	26
Figura 6. Estructura molecular del DDT.....	27
Figura 7. Estructura molecular del Diclorvos y Metamidofos.....	28
Figura 8. Estructura molecular del paration.....	28
Figura 9. Estructura molecular del malation.....	29
Figura 10. Estructura general de las piretrinas.....	30
Figura 11. Estructura general de las triazinas.....	31
Figura 12. Estructura química del paraquat y diquat respectivamente.....	32
Figura 13. Estructura química del 2,4-D y del MCPA (ácido 2-metil-4-clorofenoxiacético respectivamente.....	33
Figura 14. Distribución del consumo de pesticidas en función del destino de aplicación.....	36
Figura 15. Mecanismos de distribución de los pesticidas.....	37
Figura 16. Número de trabajos publicados según la técnica de detección de pesticidas.....	47
Figura 17. Esquema de un montaje monocanal FIA.....	55
Figura 18. Señal analítica obtenida en FIA.....	56
Figura 19. Diseño modular de un sistema FIA actual.....	58
Figura 20. FIA Lab-On-Valve (LOV).....	58
Figura 21. Proporción entre los tipos de muestras detectadas en FIA.....	59
Figura 22. Proporción entre los tipos de detección empleados en FIA.....	60
Figura 23. Aspecto de una válvula solenoide.....	63
Figura 24. Configuración ON/OFF de una válvula solenoide.....	63
Figura 25. Secuencias de inserción y perfiles de inserción obtenidos con una válvula solenoide.....	64
Figura 26. Aspecto y esquema interno de una bomba solenoide.....	92
Figura 27. Número de trabajos publicados de multiconmutación y multibombeo..	103
Figura 28. Porcentaje de artículos publicados sobre multibombeo para distintas matrices.....	104
Figura 29. Porcentaje de artículos publicados sobre multibombeo para distintos detectores.....	105
Figura 30. Número de publicaciones sobre quimioluminiscencia.....	107
Figura 31. Mecanismos básicos de las reacciones quimioluminiscentes.....	112
Figura 32. Esquema de configuración básica de un luminómetro.....	126
	353

Figura 33. Intensidad de emisión quimioluminiscente frente al tiempo en un sistema de flujo.....	129
Figura 34. Esquema funcionamiento de un tubo multiplicador.....	134
Figura 35. Sección de tubos fotomultiplicadores: configuración “side ON” (A), “end ON” (B).....	135
Figura 36. Espectro de la lámpara de mercurio de baja presión.....	143
Figura 37. Diagrama de Flujo en Conectividad Molecular.....	151
Figura 38. Transformación de un grafo en una matriz de adyacencia.....	153
Figura 39. Obtención del número de Wiener para el butano.....	154
Figura 40. Cálculo del índice de Randic para el metilbutano.....	155
Figura 41. Estrategia del análisis lineal discriminante.....	158
Figura 42. Diagrama de distribución “tipo”	160
CAPÍTULO II	
Figura 43. Esquema del montaje en flujo de multiconmutación para la determinación de pesticidas por quimioluminiscencia fotoinducida.....	167
CAPÍTULO IV	
Figura 44. Esquema del montaje en flujo de multiconmutación para la determinación de pesticidas por quimioluminiscencia fotoinducida.....	186
Figura 45. Esquema del perfil de inserción para un ciclo.....	188
Figura 46. Perfil de inserción para la determinación quimioluminiscente de pesticidas.....	191
Figura 47. Registros obtenidos en el barrido para el pesticida endotal.....	193
Figura 48. Comportamiento de los pesticidas en los diferentes medios de fotodegradación.....	224
Figura 49. Proporción de pesticidas con diferente aumento de la señal quimioluminiscente para.....	228
Figura 50. Pesticidas OFF(-)/ON(+) que aumentan su señal hasta 10 veces en medio agua.....	228
Figura 51. Pesticidas OFF(-)/ON(+) que aumentan su señal hasta 50 veces en medio agua.....	228
Figura 52. Pesticidas OFF(-)/ON(+) que aumentan su señal mas de 50 veces en medio agua.....	229
Figura 53. Proporción de pesticidas con diferente aumento de la señal quimioluminiscente para OFF(+)/ON(+) en agua.....	229
Figura 54. Pesticidas OFF(+)/ON(+) que aumentan su señal hasta 10 veces en medio agua.....	230
Figura 55. Pesticidas OFF(+)/ON(+) que aumentan su señal hasta 50 veces en medio agua.....	230

Figura 56. Proporción de pesticidas con diferente aumento de la señal quimioluminiscente para OFF(-)/ON(+) en NaOH.....	233
Figura 57. Pesticidas OFF(-)/ON(+) que aumentan su señal hasta 10 veces en medio NaOH.....	233
Figura 58. Pesticidas OFF(-)/ON(+) que aumentan su señal hasta 50 veces en medio NaOH.....	233
Figura 59. Pesticidas OFF(-)/ON(+) que aumentan su señal mas de 50 veces en medio NaOH.....	234
Figura 60. Proporción de pesticidas con diferente aumento de la señal quimioluminiscente para OFF(+)/ON(+) en NaOH.....	235
Figura 61. Pesticidas OFF(+)/ON(+) que aumentan su señal hasta 10 veces en medio NaOH.....	235
Figura 62. Pesticidas OFF(+)/ON(+) que aumentan su señal hasta 50 veces en medio NaOH.....	235
Figura 63. Proporción de pesticidas con diferente aumento de la señal quimioluminiscente para OFF(-)/ON(+) en H ₂ O ₂	238
Figura 64. Pesticidas OFF(-)/ON(+) que aumentan su señal hasta 10 veces en medio H ₂ O ₂	238
Figura 65. Pesticidas OFF(-)/ON(+) que aumentan su señal hasta 50 veces en medio H ₂ O ₂	239
Figura 66. Pesticidas OFF(-)/ON(+) que aumentan su señal mas de 50 veces en medio H ₂ O ₂	239
Figura 67. Proporción de pesticidas con diferente aumento de la señal quimioluminiscente para OFF(+)/ON(+) en H ₂ O ₂	240
Figura 68. Pesticidas OFF(+)/ON(+) que aumentan su señal hasta 10 veces en medio H ₂ O ₂	241
Figura 69. Pesticidas OFF(+)/ON(+) que aumentan su señal hasta 50 veces en medio H ₂ O ₂	241
Figura 70. Proporción de pesticidas con diferente aumento de la señal quimioluminiscente para OFF(-)/ON(+) en Fe(III).....	244
Figura 71. Pesticidas OFF(-)/ON(+) que aumentan su señal hasta 10 veces en medio Fe(III).....	244
Figura 72. Pesticidas OFF(-)/ON(+) que aumentan su señal hasta 50 veces en medio Fe(III).....	244
Figura 73. Pesticidas OFF(-)/ON(+) que aumentan su señal mas de 50 veces en medio Fe(III).....	245
Figura 74. Proporción de pesticidas con diferente aumento de la señal quimioluminiscente para OFF(+)/ON(+) en Fe(III).....	246

Figura 75. Pesticidas OFF(+)/ON(+) que aumentan su señal hasta 10 veces en medio Fe(III).....	246
Figura 76. Pesticidas OFF(+)/ON(+) que aumentan su señal hasta 50 veces en medio Fe(III).....	246
Figura 77. Proporción de pesticidas con diferente aumento de la señal quimioluminiscente para OFF(-)/ON(+) en Fe(II).....	249
Figura 78. Pesticidas OFF(-)/ON(+) que aumentan su señal hasta 10 veces en medio Fe(II).....	249
Figura 79. Pesticidas OFF(-)/ON(+) que aumentan su señal hasta 50 veces en medio Fe(II).....	250
Figura 80. Pesticidas OFF(-)/ON(+) que aumentan su señal mas de 50 veces en medio Fe(II).....	250
Figura 81. Proporción de pesticidas con diferente aumento de la señal quimioluminiscente para OFF(+)/ON(+) en Fe(II).....	251
Figura 82. Pesticidas OFF(+)/ON(+) que aumentan su señal hasta 10 veces en medio Fe(II).....	251
Figura 83. Pesticidas OFF(+)/ON(+) que aumentan su señal hasta 50 veces en medio Fe(II).....	252
Figura 84. Búsqueda bibliográfica de estudios previos sobre la quimioluminiscencia de los pesticidas ensayados.....	254

CAPÍTULO V

Figura 85. Pesticidas representativos del grupo entrenamiento clasificados como (+) o (-).....	268
Figura 86. Pesticida del grupo de entrenamiento de inactivos clasificado como positivo.....	269
Figura 87. Diagramas de distribución de la actividad de quimioluminiscencia fotoinducida.....	270
Figura 88. Resultados experimentales de los pesticidas no empleados para el desarrollo y validación de la Función Discriminante (FD).....	272

CAPÍTULO VI

Figura 89. Sistema de flujo utilizado en la determinación de imidazolinonas.....	282
Figura 90. Perfil de inserción para los ensayos previos.....	283
Figura 91. Estudio de los medios de fotodegradación para las imidazolinonas.....	284
Figura 92. Optimización del tiempo de fotodegradación.....	286
Figura 93. Optimización de la concentración de KMnO ₄	287
Figura 94. Estudio de sensibilizadores para las imidazolinonas.....	289
Figura 95. Reoptimización del tiempo de fotodegradación.....	291
Figura 96. Optimización del caudal del sistema de flujo.....	292

Figura 97. Estudio del número de inserciones en V1.....	294
Figura 98. Optimización de la proporción de mezcla en V1.....	294
Figura 99. Optimización del número de pulsos en V2.....	295
Figura 100. Optimización de la proporción de mezcla en V2.....	296
Figura 101. Calibrado de imazapir y forma de las señales analíticas.....	299
CAPÍTULO VII	
Figura 102. Estructura molecular de IAA e IBA.....	309
Figura 103. Esquema montaje para la determinación por quimioluminiscencia directa.....	311
Figura 104. Diagrama del perfil de inserción para la secuencia (A) (B).....	312
Figura 105. Estudio del comportamiento de IAA e IBA para diferentes oxidantes..	314
Figura 106. Optimización del montaje y secuencias de inserción.....	316
Figura 107. Influencia del tiempo de integración para 10 mg L ⁻¹ de IAA e IBA.....	318
Figura 108. Influencia de la frecuencia de pulsos.....	320
Figura 109. Optimización del número de pulsos de pesticida para 10 mgL ⁻¹ de IAA e IBA.....	321
Figura 110. Optimización del número de pulsos de pesticida para 1 mg L ⁻¹ de IAA e IBA.....	322
Figura 111. Optimización del número de pulsos de oxidante para 1 mg L ⁻¹ de IAA e IBA.....	322
Figura 112. Optimización de la concentración de KMnO ₄ para IAA (10 mg L ⁻¹).....	324
Figura 113. Optimización de la concentración de KMnO ₄ para IAA (1 mg L ⁻¹).....	324
Figura 114. Optimización de la concentración de H ₂ SO ₄ para IAA (1 mg L ⁻¹).....	325
Figura 115. Optimización de la concentración de K ₃ Fe(CN) ₆ para IBA (10 mg L ⁻¹)...	326
Figura 116. Optimización de la concentración de K ₃ Fe(CN) ₆ para IBA (1 mg L ⁻¹).....	326
Figura 117. Influencia de la concentración de NaOH en el sistema oxidante K ₃ Fe(CN) ₆ , para 10 mg L ⁻¹ de IBA.....	327
Figura 118. Estudio de sensibilizadores para IAA e IBA (5mg L ⁻¹).....	329
Figura 119. Fiagrama para el calibrado de IAA.....	331
Figura 120. Fiagrama para calibrado IBA.....	331

CAPÍTULO I

Tabla 1. Clasificación toxicológica de los pesticidas según la Organización Mundial de la Salud (OMS).....	21
Tabla 2. Etiquetado de los plaguicidas según la categoría toxicológica (OMS).....	21
Tabla 3. Acción específica de pesticidas.	24
Tabla 4. Algunos Kits de inmunoensayos para el análisis de pesticidas.....	54
Tabla 5. Aplicaciones analíticas de la multiconmutación.	69
Tabla 6. Aplicaciones analíticas la multiconmutación en la determinación de pesticidas.	89
Tabla 7. Aplicaciones analíticas del análisis por multibombeo.	94
Tabla 8. Reacciones y mecanismos de los principales sistemas quimioluminiscentes.....	117
Tabla 9. Aplicaciones de la quimioluminiscencia fotoinducida en flujo continuo a la determinación de pesticidas	146
Tabla 10. Propiedades químicas estudiadas en la bibliografía con conectividad molecular.	161

CAPÍTULO IV

Tabla 11. Clasificación química de los pesticidas estudiados.....	194
Tabla 12. Comportamiento quimioluminiscente de los pesticidas en diferentes medios.	211

CAPÍTULO V

Tabla 13. Símbolos y definiciones de índices topológicos utilizados en este trabajo.....	263
Tabla 14. Resultados obtenidos del estudio LDA y clasificación de los compuestos de patrón de actividad quimioluminiscencia inducida propuestos.	267
Tabla 15. Clasificación teórica y resultados experimentales de los compuestos probados.	272

CAPÍTULO VI

Tabla 16. Estructura molecular de las imidazolinonas y sus usos comunes.....	278
Tabla 17. Resumen de los parámetros físico-químicos y de flujo para el montaje optimizado	297
Tabla 18. Estudio de parámetros analíticos.	298
Tabla 19. Estudio de interferentes para imidazolinonas.	300
Tabla 20. Resultados de los ensayos de recuperación para muestras reales.	301

CAPÍTULO VII

Tabla 21. Señales analíticas para IAA con diferentes oxidantes.	313
Tabla 22. Señales analíticas para IBA con diferentes oxidantes.....	313
Tabla 23. Condiciones analíticas en la optimización de IAA e IBA.	315
Tabla 24. Resumen condiciones químicas y de flujo del montaje.....	317
Tabla 25. Valores óptimos de los parámetros optimizados.	329
Tabla 26. Características analíticas del método.	330
Tabla 27. Estudio de interferentes para auxinas.	332
Tabla 28. Resultado de la aplicación del método a muestras reales.	334

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. "Automatización y Miniaturización en la Química Analítica", M. Valcarcel, M.S.C., Ed. Springer., (2000), 280.
2. "Metodologías analíticas alternativas para la determinación de plaguicidas en aguas y productos agroalimentarios" L.M.Rabelo Pérez, (2009), La Laguna, Tenerife.
3. "Sample pre-fractionation of environmental and food samples using LC-GC multidimensional techniques", G. Purcaro, S. Moret, L. Conte, *TrAC Trends in Anal. Chem.*, (2013). 43(0), 146-160.
4. "Rapid analysis of multicomponent pesticide mixture by GC-MS with the aid of chemometric resolution", L. Miao, W. Cai, X. Shao, *Talanta*, (2011), 83(4), 1247-1253.
5. "Chemiluminescence in Analytical Chemistry", A.M. Garcia Campaña, W.R.G. Baeyens, New York, Ed. Marcel Dekker, (2001).
6. "Native vs photoinduced chemiluminescence in dimethoate determination", M. Catalá Icardo, López Paz, J. L. Choves Barón, C. Peña Bádena, *Anal. Chim. Acta*, (2012), 710(0), 81-87.
7. "Photo-induced fluorescence properties of the propanil herbicide and analytical usefulness", O. M. A. Mbaye, M. D. Gaye Seye, A. Coly, A. Tine, M. A. Oturan, N. Oturan, J. J. Aaron, *Microchem. J.*, (2013), 110(0), 579-586.
8. "Photoinduced chemiluminescence of pharmaceuticals", B. Gómez Taylor, M. Palomeque, J. V. García Mateo, J. Martínez Calatayud, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, (2006), 41(2), 347-357.
9. "Enhanced flow injection chemiluminometric determination of sulphonamides by on-line photochemical reaction", M.C Catalá Icardo, J.V. García Mateo, M. Fernández Lozano, J. Martínez Calatayud, *Anal. Chim. Acta*, (2003), 499(1-2), 57-69.
10. "Monografía I. Diseño de medicamentos. Capítulo. Diseño de fármacos por conectividad molecular", J. Gálvez Álvarez, R.García Domenech, *Publicaciones de la Real Academia Nacional de Farmacia (RANF)*, (1998) 357-386.
11. "New Potential Antihistaminic Compounds. Virtual Combinatorial Chemistry, Computational Screening. Real Synthesis and Pharmacological Evaluation", M. Duart, G.M. Antón-Fos, P.A. Alemán, J.B. Gay-Roig, M.E. González-Rosende, J. Gálvez, R. García-Domenech, *J. Med. Chem.*, (2005) 48, 1260-1264.
12. "Aplicación de los métodos QSPR en fenómenos de adsorción sobre materiales carbonáceos", H. Casteñeta, E.A. Castro, *Investigación y Desarrollo*, (2005), 26, 4-10.

13. "CODESSA-Base theoretical QSPR model for hydantoin HPLC-RT lipophilicities", AR. Katritzky, S. Perumal, R. Petrukhin, E. Kleinpeter, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, (2001), 41, 569-574.
14. "QSPR correlation and predictions of GC retention indexes for methyl-branched hydrocarbons produced by insects", AR. Katritzky, K. Chen, U. Maran, D.A . Carlson, *Anal. Chem.*, (2000), 72(1), 101-109.
15. "Prediction of chromatographic properties of organophosphorus Insecticides by molecular connectivity", R. Gozalbes, J.V. Julián Ortiz, G.M. Antón Fos, J. Gálvez Álvarez, R. García Domenech, *Chromatographia*, (2000), 51, 331-337.
16. "Prediction of the chemiluminescent behavior of pharmaceuticals and pesticides", L. Lahuerta Zamora, Y. Fuster Mestre, M.J. Duart, G.M. Anton Fós, R. García Doménech, J. Galvez Alvarez, J. Martinez Calatayud, *Anal. Chem.*, (2001) 73(17), 4301-4306.
17. "Plaguicidas Agrícolas", C. Barberá, Ediciones Omega, (1989).
18. La química de los pesticidas y su metodología analítica. W.R. Davos, Colección de cuadernillos de la Universidad del centro educativo latinoamericano, (2002), 61.
19. "Application of principal component analysis to the study of multiple equilibria systems : Study of copper(II)/salicylate/mono-, di- and triethanolamine systems" P. Tauler, E. Casassas, *Anal. Chim. Acta*, (1989), 223(0), 257-268.
20. "Theory of Analytical Chemistry", K.S. Booksh, B.R. Kowalsky., *Anal. Chem.*, (1994) 66, 782A-791A.
21. "Lucha contra la contaminación de recursos hídricos", E.D. Onley, Estudio de la FAO Riego y Grenaje-55, ISBN: 92-5-303875-6, (1997).
22. "Flow injection spectrophotometric determination of carbofuran in commercial pesticides formulations", R. Zanella, R.M. Dallago, E.M.M. Flores, A.F. Martins, *Anal. Lett.*, (1999), 32(3), 593-600.
23. "Química Agrícola II. Plaguicidas y Fitorreguladores", E. Primo Yúfera, J.M. Carrasco Dorrien, Ed. Alhambra, (1980).
24. "The pesticide Book", G.W. Ware, Ed. W.H. Freeman, Fresno. (1994).
25. "Handbook of Pesticide Toxicology", D.E. Ray, San Diego (CA), Ed. Academic Press, (1991).
26. "Mammalian toxicology of pyrethroids insecticides" A.J. Gray, D.M. Soderlund, Ed. Academic Press. (1985).

27. “Los plaguicidas botánicos y su importancia en la agricultura orgánica”, M Alfonso, R. Avilés, N. González, X. Cruz, R. Villasana, V. Rodríguez, *Agricultura Orgánica*, (2002), 2, 26-30.
28. “Monitoring of pyrethroid metabolites in human urine using solid-phase extraction followed by gas chromatography-tandem mass spectrometry”, F.J. Arrebola, J.L. Martínez Vidal, A. Fernández Gutiérrez, M.H. Akhtar, *Anal. Chim. Acta*, (1999), 401(1-2), 45-54.
29. “Determination of pesticide transformation products: A review of extraction and detection methods”, J. L. Martínez Vidal, P. Plaza-Bolaños, R. Romero-González, A. Garrido Frenich, *J. Chromatogr. A*, (2009), 1216(40), 6767-6788.
30. IPCS, International Programme on Chemical Safety. Environmental Health Criteria 116. Tributyltin Compounds, (1990).
31. “Sample treatment and determination of pesticide residues in fatty vegetable matrices: A review”. B. Gilbert-Lopez, J.F. Garcia Reyes, A. Molina Diaz, *Talanta*, (2009), 79(2), 109-128.
32. “Multiresidue analysis of pesticides in olive oil by gel permeation chromatography followed by gas chromatography–tandem mass-spectrometric determination”, A.G. Sánchez, N.R. Martos, E. Ballesteros, *Anal. Chim. Acta*, (2006), 558(1–2), 53-61.
33. “Development of a pressurized liquid extraction and clean-up procedure for the determination of α -endosulfan, β -endosulfan and endosulfan sulfate in aged contaminated Ethiopian soils”, A. Hussen, R. Westbom, N. Megersa, L. Mathiasson, E. Björklund, *J. Chromatogr. A*, (2006), 1103(2), 202-210.
34. “Microwave-assisted extraction versus Soxhlet extraction in the analysis of 21 organochlorine pesticides in plants”, M. Barriada Pereira, E. Concha Graña, M.J. González Castro, S. Muniategui-Lorenzo, P. López-Mahía, D. Prada-Rodríguez, E. Fernández-Fernández, *J. Chromatogr. A*, (2003), 1008(1), 115-122.
35. “Residue analysis of organophosphorus pesticides in animal matrices by dual column capillary gas chromatography with nitrogen–phosphorus detection”, G. Pagliuca, T. Gazzotti, E. Zironi, P. Sticca, *J. Chromatogr. A*, (2005), 1071(1–2), 67-70.
36. “Rapid preconcentration method for the determination of pyrethroid insecticides in vegetable oils and butter fat and simultaneous determination by gas chromatography–electron capture detection and gas chromatography–mass spectrometry”, A. Ramesh A., M. Balasubramanian, *Analyst*, (1998) 123 1799-1802.

37. "Polymer analysis by gel permeation chromatography – A historical perspective", Saunders, *LC-GC Europe* 17, (2004) 650-655.
38. "Automated on-line gel permeation chromatography-gas chromatography for the determination of organophosphorus pesticides in olive oil", J.J. Vreuls, R.J.J. Swen, V.P. Goudriaan, M.A.T. Kerkhoff, G.A. Jongenotter, U.A.Th Brinkman, *J. Chromatogr. A*, (1996), 750(1–2), 275-286.
39. "Evaluation of different sample treatments for determining pesticide residues in fat vegetable matrices like avocado by low-pressure gas chromatography–tandem mass spectrometry", J.L. Fernández Moreno, F.J. Arrebola Liébanas, A. Garrido Frenich, J.L. Martínez Vidal, *J. Chromatogr. A*, (2006), 1111(1), 97-105.
40. "Simplified pesticide multiresidue analysis in virgin olive oil by gas chromatography with thermoionic specific, electron-capture and mass spectrometric detection", M. Guardia-Rubio, M.L. Fernández De Córdoba, M.J. Ayora Cañada, A. Ruiz Medina, *J. Chromatogr. A*, (2006) 1108(2), 231-239.
41. "Multiresidue analysis of organochlorine and organophosphorus pesticides in muscle of chicken, pork and lamb by gas chromatography–triple quadrupole mass spectrometry", A. Garrido Frenich, J.L. Martínez Vidal, A.D. Cruz Sicilia, M.J. González Rodríguez, P. Plaza Bolaños, *Anal. Chim. Acta*, (2006), 558(1–2), 42-52.
42. "Determination of nitrogen- and phosphorus-containing pesticide residues in vegetables by gas chromatography with nitrogen-phosphorus and flame photometric detection after gel permeation chromatography and a two-step minicolumn cleanup", E. Ueno, H. Oshima, I. Saito, H. Matsumoto, *J. AOAC Int*, (2003), 86,1241-1251.
43. "Analytical methods applied to the determination of pesticide residues in foods of animal origin. A review of the past two decades", M. LeDoux, *J. Chromatogr. A*, (2011), 1218(8), 1021-1036.
44. "Determination of pesticides and their degradation products in soil: critical review and comparison of methods", V. Andreu, Y. Picó, *TrAC Trends Anal. Chem.*, (2004), 23(10-11), 772-789.
45. "Liquid chromatography at elevated temperatures with pure water as the mobile phase", K. Hartonen, M.L. Riekkola, *TrAC Trends Anal. Chem.*, (2008), 27(1), 1-14.
46. "Capillary electrophoresis for the determination of pesticide residues", Y. Picó, R. Rodríguez, J. Mañes, *TrAC Trends Anal. Chem.*, (2003), 22(3), 133-151.
47. "New approaches to sample preparation for capillary electrophoresis", X. Wu, *TrAC Trends Anal. Chem.*, (2003), 22(1), 48-58.

48. "Simultaneous UV and electrochemical determination of the herbicide asulam in tap water samples by micellar electrokinetic capillary chromatography", M. Chicharro, A. Zapardiel, E. Bermejo, A. Sánchez, *Anal. Chim. Acta*, (2002), 469(2), 243-252.
49. "Nonaqueous capillary electrophoresis equipped with amperometric detection for analysis of chlorinated phenolic compounds", J.H.T. Luong, A. Hilmi, A.L. Nguyen, *J. Chromatogr. A*, (1999), 864(2), 323-333.
50. "Comparison of biosensoric and chromatographic methods for the detection of pesticides", Z. Grosmanovaacute, J. Krejccaroniacute, J. Tyacutenek, P. Cuhra, S. Barscaronovaacute, *J. Environ. Anal. Chem.*, (2005), 85(12-13), 885-893.
51. "Biosensors for the detection of pesticides", J.L. Marty, B. Leca, T. Noguier, *Analisis Magazine*, (1998), 26(6), 144-148.
52. "Multi-analyte SPR immunoassays for environmental biosensing of pesticides. Analytical-and-Bioanalytical-Chemistry", E. Mauriz, A. Calle, J.J. Manclus, L.M. Lechuga, *Anal. Bioanal.Chem.*, (2007), 387(4), 1449-1458.
53. "Biosensors for monitoring insecticides and herbicides - a survey", N. Verma, S.S. Dhillon, *Int. J. Environ. Stud.*, (2003), 60(1), 29-43.
54. "Técnicas inmunoquímicas para el análisis de residuos de pesticidas", L.A. Betancur, J.Fernández, R. Ocampo, L.A. Ríos, *Revista de la Univ. de Caldas*, (2006), 105-122.
55. "Flow injection analysis Part I. New concept of fast continuous-flow analysis", J. Růžička, E.H. Hansen, *Anal. Chim. Acta*, (1975), 78(1), 145-157.
56. "Rapid analysis of discrete samples: The use of nonsegmented, continuous flow", K.K. Stewart, G.R. Beecher, P.E. Hare, *Anal Biochem*, (1976), 70(1), 167-173.
57. "Multicommutation as a new and powerful analytical tool", M. Catalá Icardo, J.V. García Mateo, J. Martínez Calatayud, *TrAC-Trends Anal. Chem.*, (2002), 21(3), 1-9.
58. "A novel-approach to non-segmented flow analysis. 3. Nitreta and ammonium in waters", D.J. Malcolmelawes, C. Pasquini, *J. Autom. Chem.*, (1988), 10(4), 192-197.
59. "High speed potentiometric analyzer equipped with an ion-selective electrode detector", H. Hara, N. Ishio, K. Takahashi, *Anal. Chim. Acta*, (1993), 281(1), 45-51.
60. "Multiplexed four-channel online iodine monitor Instrum", J.E Atwater, R.R.J. Wheeler, R.L. Sauer, J.R. Schultz, *Sci. Technol.*, (1994), 22(3), 217-229.

61. "Multicommutation in flow analysis. Part 1. Binary sampling: concepts, instrumentation and spectrophotometric determination of iron in plant digests", B.F. Reis, M.F. Giné, E.A.G. Zagatto, J.L.F.C. Lima, R.A. Lapa, *Anal. Chim. Acta*, (1994), 293(1-2), 129-138.
62. "Multicommutation in flow analysis. Part 2. Binary sampling for spectrophotometric determination of nickel, iron and chromium in steel alloys", P.B. Martelli, B. F. Reis, A.M. Kronka, E. Bergamin, M. Korn, E.A.G. Zagatto, J.L.F.C. Lima, A.N. Araujo. *Anal. Chim. Acta*, (1995), 308(1-3), 397-405.
63. "Determination of arsenic in foods by dry ashing, tandem online continuous separation, and ICP-OES analysis", M.L.M. Cervera, R. Sanchez Uria, J.E. Menéndez García, A. Sanz Medel, *At. Spectroscop.*, (1995), 16(4), 139-144.
64. "Multicommutation in flow analysis. Part 3. Spectrophotometric kinetic determination of creatinine in urine exploiting a novel zone sampling approach", A.N. Araujo, J.F.C. Lima, B.F. Reis, E.A.G. Zagatto, *Anal. Chim. Acta*, (1995), 310(3), 447-452.
65. "Automation of low injection gas diffusion-ion chromatography for the nanomolar determination of methylamines and ammonia in sea water and atmospheric samples" S.W. Gibb, J.W. Wood, R. Fauzi, C. Mantoura, *J. Autom. Chem.*, (1995), 17(6), 205-212.
66. "In-vivo sample uptake and online measurements of cobalt in whole-blood by microwave-assisted mineralization and flow-injection electrothermal atomic-absorption spectrometry" M. Burguera, J.L. Burguera, C. Rondon, C. Rivas, P. Carrero, M. Gallignani, M.R. Brunetto, *Anal. At. Spectrom.*, (1995), 10(5), 343-347.
67. "Factorial design for the response exploration of a flow-injection system", A.M.D. Delacruz, M. Burguera, J.L. Burguera, C. Rivas, *Talanta*, (1995), 42(5), 701-709.
68. "Novel measurement of hypoxanthine in fish using direct measurement probe and chemiluminescence flow injection analysis", K. Hayashi, T. Okugawa, Y. Kozuka, S. Sasaki, K. Ikebukuro, I. Karube, *J. Food Sci.*, (1996), 61(4), 736-740.
69. "Flow system based on a binary sampling process for automatic dilutions prior to flame atomic spectrometry", M.F. Giné, A.P. Packer, T. Blanco, B.F. Reis, *Anal. Chim. Acta*, (1996), 323(1-3), 47-53.
70. "Multicommutation in flow analysis. Part 4. Computer-assisted splitting for spectrophotometric determination of copper and zinc in plants", C.C. Oliveira, R.P. Sartini, B.F. Reis, E.A.G. Zagatto, *Anal. Chim. Acta*, (1996), 332(2-3), 173-178.

71. "Monitoring of dissolved reactive phosphorus in wastewaters by flow injection analysis. Part 2. On-line monitoring system", R.L. Benson, Y.B. Truong, I.D. McKelvie, G.W. Bryant, W.P. Hilkmann, *Water Res.*, (1996), 30(9), 1965-1971.
72. "Multicommutation in flow analysis. Part 5: Binary sampling for sequential spectrophotometric determination of ammonium and phosphate in plant digests", E.A.M. Kronka, B.F. Reis, M. Korn, F.H. Bergamin, *Anal. Chim. Acta*, (1996), 334(3), 287-293.
73. "Multicommutation in flow analysis. Part 6. Binary sampling for wide concentration range turbidimetric determination of sulphate in plant digests", J.A. Vieira, B.F. Reis, E.A.M. Kronka, A.P.S. Paim, M.F. Giné, *Anal. Chim. Acta*, (1998), 366(1-3), 251-255.
74. "Automatic multicommutation flow system for wide range spectrophotometric calcium determination", F.B.R.P. Rocha, P.B. Martelli, R.M. Frizzarin, B.F. Reis, *Anal. Chim. Acta*, (1998), 366(1-3), 45-53.
75. "A multicommutated flow system with on-line compensation of the Schlieren effect applied to the spectrophotometric determination of pindolol", R.A.S. Lapa, J.L.F.C Lima, B.F. Reis, L.M.J. Santos, E.A.G. Zagatto. *Anal. Chim. Acta*, (1998), 366(1-3), 209-215.
76. "Automated flow-injection system for extending the linear range", L.F. Gouveia, J.L.F. Costa Lima, J.A.G. Morais, *Anal. Chim. Acta*, (1998), 366(1-3), 271-279.
77. "Multi-insertion of small controlled volumes of solutions in a flow assembly for determination of nitrate (photoreduction) and nitrite with proflavin sulphate" J. Martinez Calatayud, J.V. Garcia Mateo, V. David, *Analyst* (1998), 123(3), 429-434.
78. "On-line separation and preconcentration of cadmium, lead and nickel in a fullerene (C60) minicolumn coupled to flow injection tungsten coil atomic absorption spectrometry", M.M. Silva, Arruda, A.Z. Marco, F.J. Krug, P.V. Oliveira, Z.F. Queiroz, M. Gallego, M. Valcárcel, *Anal. Chim. Acta*, (1998), 368(3), 255-263.
79. "Multicommutation in flow analysis exploiting a multizone trapping approach: spectrophotometric determination of boron in plants", C. de Azevedo Tumang, G.N. Caseri de Luca, R.F. Fernandes, B.F. Reis, F.J. Krug, *Anal. Chim. Acta*, (1998), 374(1), 53-59.
80. "Monosegmented flow system exploiting multicommutation applied to spectrophotometric determination of manganese in soybean digests", M. Smiderle, B.F. Reis, F.B.R.P. Rocha, *Anal. Chim. Acta*, (1999), 386(1-2), 129-135.

81. "Determination of glucose in soft drink and sugar-cane juice employing a multicommutation approach in flow system and enzymatic reaction", E.A.M. Kronka, A.P.S. Paim, B.F. Reis, J.L.F.C. Lima, R.A. Lapa, *Fresenius J. Anal. Chem.*, (1999), 364(4), 358-361.
82. "A field-deployable instrument for the measurement and speciation of arsenic in potable water", H. Huang, P.K. Dasgupta, *Anal. Chim. Acta*, (1999), 380(1), 27-37.
83. "Automated flow injection system for the preconcentration of bismuth and lead from acid solutions of alloys and determination by electrothermal atomic absorption spectrometry", M.B.O. Giacomelli, E.M. Ganzarolli, A.J. Curtius, *Spectrochim. Acta, Part B*, (2000), 55(5), 525-533.
84. "Determination of volatile elements in biological materials by isotopic dilution ETV-ICP-MS after dissolution with tetramethylammonium hydroxide or acid digestion", D. Pozebon, V.L. Dressler, A.J. Curtius, *Talanta*, (2000), 51(5), 903-911.
85. "Dual-stopped-flow spectrophotometric determination of amiloride hydrochloride in a multicommutated flow system", R.A.S. Lapa, J.L.F.C. Lima, J.O.L.M. Santos, *Anal. Chim. Acta*, (2000), 407(1-2), 225-231.
86. "Automatic multicommutated flow system for ethanol determination in alcoholic beverages by spectrophotometry", A.L.D. Comitre, B.F. Reis, *Lab. Rob. Autom.*, (2000), 12(1), 31-36.
87. "Determination of phenols in natural waters with a flow-analysis method and chemiluminescence detection", J. Michalowski, P. Halaburda, A. Kojlo, *Anal. Lett.*, (2000), 33(7), 1373-1386.
88. "A flow system exploiting multicommutation for speciation of inorganic nitrogen in waters", R.B.R.P. Rocha, B.F. Reis, *Anal. Chim. Acta*, (2000), 409(1-2), 227-235.
89. "Selective chlorine determination by gas diffusion in a tandem flow assembly and spectrophotometric detection with o-dianisidine", M.C. Catalá Icardo, J.V. García Mateo, J. Martínez Calatayud, *Anal. Chim. Acta*, (2001), 443(1), 153-163.
90. "Turbidimetric determination of sulphate employing gravity flow-based systems", J.A. Vieira, I.M. Raimundo, B.F. Reis, *Anal. Chim. Acta*, (2001), 438 (1-2), 75-81.
91. "An improved flow system for spectrophotometric determination of anions exploiting multicommutation and multidetection", F.B.R.P. Rocha, P.I.C.B. Martelli, B.F. Reis, *Anal. Chim. Acta*, (2001), 438(1-2): p. 11-19.

92. "A multicommutation-based flow system for multi-element analysis in pharmaceutical preparations", F.B.R.P. Rocha, P.I.C.B. Martelli, B.F. Reis, *Talanta*, (2001), 55(4),861-869.
93. "Multicommutation flow system for spectrophotometric L(+)lactate determination in silage material using an enzymatic reaction", C.A. Tumang, E.P. Borges, B.F. Reis, *Anal. Chim. Acta*, (2001), 438(1-2), 59-65.
94. "A flow system with a conventional spectrophotometer for the chemiluminescent determination of lactic acid in yoghurt", P.B. Martelli, B.F. Reis, A.N. Araujo, M. Conceicao, B.S.M. Montenegro, *Talanta*, (2001), 54(5), 879-885.
95. "Implementation of chemiluminescence detection in the multisyringe flow injection technique", N. Pizã, M. Miró, G. de Armas, E. Becerra, J.M. Estela, V. Cerdá, *Anal. Chim. Acta*, (2002), 467(1-2), 155-166.
96. "Automated flow analysis system based on multicommutation for Cd, Ni and Pb on-line pre-concentration in a cationic exchange resin with determination by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry", C.E.S. Miranda, B.F.Reis, N. Baccan, A.P. Packer, M.F. Giné, *Anal. Chim. Acta*, (2002), 453(2), 301-310.
97. "Automatic flow system titration based on multicommutation for spectrophotometric determination of total acidity in silage extracts", C.A. Tumang, A.P.S. Paim, B.F. Reis, *J. AOAC Int.*, (2002), 85(2), 328-332.
98. "Flow system exploiting multicommutation to increase sample residence time for improved sensitivity. Simultaneous determination of ammonium and ortho-phosphate in natural water", R.N. Fernandes, B.F. Reis, *Talanta*, (2002), 58(4), 729-737.
99. "Automatic potentiometric flow titration procedure for ascorbic acid determination in pharmaceutical formulations", A.P.S. Paim, C.M.N.V. Almeida, B.F. Reis, R.A.S. Lapa, E.A.G. Zagatto, J.L.F. Costa Lima, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, (2002), 28(6), 1221-1225.
100. "Time-based multisyringe flow injection system for the spectrofluorimetric determination of aluminium", G. de Armas, M. Miró, A. Cladera, J.M. Estela, V. Cerdá, *Anal. Chim. Acta*, (2002), 455(1), 149-157.
101. "A multicommutated flow procedure for the determination of cholesterol in animal blood serum by chemiluminescence", C.K. Pires, B.F. Reis, C.X. Galhardo, P.B. Martelli, *Anal. Lett.*, (2003), 36(14), 3011-3024.

102. "A multicommutated flow system for sequential spectrophotometric determination of hydrosoluble vitamins in pharmaceutical preparations", F.B.R.P. Rocha, O. Fatibello Filho, B.F. Reis, *Talanta*, (2003), 59(1), 191-200.
103. "An automatic flow procedure for the determination of 3-hydroxybutyrate in animal serum and plasma", C.K. Pires, P.B. Martelli, B.F. Reis, B.F., J.L.F.C. Lima, M.L.M.F.S. Araiva, *J. Agric. Food. Chem.*, (2003), 51(9), 2457-2460.
104. "Analyser of chromium and/or cobalt", L.A. Tortajada Genaro, P. Campíns Falcó, F. Bosch Reig, *Anal. Chim. Acta*, (2003), 488(2), 243-254.
105. "Automatic procedure exploiting multicommutation in flow analysis for simultaneous spectrophotometric determination of nonstructural carbohydrates and reducing sugar in forage materials", C.A. Tumang, M.C. Tomazzini, B.F. Reis, *Anal. Sci.*, (2003), 19(12), 1683-1686.
106. "Multicommutation cold vapour atomic fluorescence determination of Hg in water", B.F. Reis, E. Ródenas Torralba, J. Sancenón Buleo, A. morales Rubio, M. de la Guardia, *Talanta*, (2003), 60(4), 809-819.
107. "Liquid extraction procedure exploiting multicommutation in flow system for the determination of molybdenum in plants", A.L.D. Comitre, B.F. Reis, *Anal. Chim. Acta*, (2003), 479(2), 185-190.
108. "An improved flow system for phenols determination exploiting multicommutation and long pathlength spectrophotometry", K.O. Lupetti, F.B.R.P. Rocha, O. Fatibello Filho, *Talanta*, (2004), 62(3), 463-467.
109. "A tandem-flow assembly for the chemiluminometric determination of hydroquinone", B.G.T. Corominas, A.C. Icardo, L.L. Zamora, J. V. G. Mateo, J.M. Calatayud, *Talanta*, (2004), 64(3), 618-625.
110. "Simultaneous photometric determination of albumin and total protein in animal blood plasma employing a multicommutated flow system to carried out on line dilution and reagents solutions handling", G.C. Luca, B.F. Reis, *Spectrochim. Acta, Part A -Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, (2004), 60(3), 579-583.
111. "Automatic fluorimetric procedure for the determination of aluminium in plant nutrient solution and natural water employing a multicommutated flow system", A.P.S.R. Paim, B. F. Reis, V.A. Vitorello, *Mikrochim. Acta*, (2004), 146(3-4), 291-296.
112. "Multicommutation ATR-FTIR: determination of sodium alpha-olefin sulfonate in detergent formulations", J.F. Ventura Gayete, B.F. Reis, S. Garrigues, A. Morales Rubio, M. de la Guardia, *Microchem. J.*, (2004), 78(1), 47-54.

113. "A multicommutated flow system for the determination of copper, chromium, iron and lead in lubricating oils with detection by flame AAS", B.F. Reis, M. Knochen, G. Pignalosa, N. Cabrera, J. Giglio, *Talanta*, (2004), 64(5), 1220-1225.
114. "Multicommutation hydride generation atomic fluorescence determination of inorganic tellurium species in milk", E. Rodenas Torralba, A. Morales Rubio, M. de la Guardia, *Food Chem.*, (2005), 91(1), 181-189.
115. "Automatic flow procedure for the determination of glycerol in wine using enzymatic reaction and spectrophotometry", E. N. Fernandes, M.N. de Campos Moura, J.L.F.C. Lima, B.F. Reis, *Microchem. J.*, (2004), 77(2), 107-112.
116. "Multicommutation Fourier transform infrared determination of benzene in gasoline", E. Rodenas-Torralba, J. Ventura Gayete, A. Morales Rubio, S. Garrigues, M. de la Guardia, *Anal. Chim. Acta*, (2004), 512(2), 215-221.
117. "Cold vapour atomic fluorescence determination of mercury in milk by slurry sampling using multicommutation", P. Cava-Montesinos, P., E. Ródenas Torralba, A. Morales-Rubio, M. L. Cervera, M. de la Guardia, *Anal. Chim. Acta*, (2004), 506(2), 145-153.
118. "Automated simultaneous triple dissolution profiles of two drugs, sulphamethoxazol-trimethoprim and hydrochlorothiazide-captopril in solid oral dosage forms by a multicommutation flow-assembly and derivative spectrophotometry", D. Tomsu, M.C. Catalá Icardo, J. Martínez Calatayud, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, (2004), 36(3), 549-557.
119. "Multicommutated generation of concentration gradients in a flow-batch system for metronidazole spectrophotometric determination in drugs", E.P. Medeiros, E.C.L. Nascimento, A.C.D. Medeiros, J.G.V. Neto, E.C. da Silva, M.C.U. Araujo, *Anal. Chim. Acta*, (2004), 511(1), 113-118.
120. "Multicommutated flow system for the chemiluminometric determination of clomipramine in pharmaceutical preparations", K.L. Marques, J.O.L.M. Santos, J.L.F.C. Lima, *Anal. Chim. Acta*, (2004), 518(1-2), 31-36.
121. "An overview on flow methods for the chemiluminescence determination of phosphorus", I.S.P.A Morais, V. Ildiko, A. Toht, O.S.S. Rangel, *Talanta*, (2005) 66(2), 341-347.
122. "Implementation of multicommutation principle with flow-through multiptosensors", E.J. Llorent Martínez, P. Ortega Barrales, A. Molina Díaz, *Anal. Chim. Acta*, (2005), 545(19), 113-118.
123. "An environmentally friendly multicommutated alternative to the reference method for anionic surfactant determination in water", E. Rodenas Torralba, B.F. Reis, A. Morales-Rubio, M. de la Guardia, *Talanta*, (2005), 66(3), 591-599.

124. "Multicommutated flow-through fluorescence optosensor for determination of furosemide and triamterene", E. Llorent-Martinez, P. Ortega Barrales, A. Molina Diaz, *Anal. Bioanal. Chem.*, (2005), 383(5), 797-803.
125. "Automatic flow procedure based on multicommutation exploiting liquid-liquid extraction for spectrophotometric lead determination in plant material" A.L.C.D. Comitre, B.F. Reis, *Talanta*, (2005), 65(4), 846-852.
126. "A clean method for flow injection spectrophotometric determination of cyclamate in table sweeteners", F.B.R.P. Rocha, E. Rodenas Torralba, A. Morales Rubio, M. de la Guardia, *Anal. Chim. Acta*, (2005), 547(2), 204-208.
127. "On-line ion pair solid-phase extraction of electrokinetic multicommutation for determination of trace anion surfactants in pond water", Y.Y. Hu, Y.Z. He, L.L. Quian, L. Wang, *Anal. Chim. Acta*, (2005), 536(1-2), 251-257.
128. "Chemiluminometric determination of propranolol in an automated multicommutated flow system", K.L. Marques, J.L.M. Santos, J.L.F.C. Lima, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, (2005), 39(5), 886-891.
129. "A downsized flow set up based on multicommutation for the sequential photometric determination of iron(II)/iron(III) and nitrite/nitrate in surface water", M.R.A. Feres, B.F. Reis, *Talanta*, (2005), 68(2), 422-428.
130. "Microflow injection system based on a multicommutation technique for nitrite determination in wastewaters", M. Baeza, M. Ibanez García, N. Baucells, J. Bartroli, J. Alonso, *The Analyst*, (2006), 131(10), 1109-1115.
131. "An improved procedure for phosphorous fractionation in plant materials exploiting sample preparation and monosegmented flow analysis", A.A.K. Maruchi, F.B.R.P. Rocha, *Microchem. J.*, (2006), 82(2), 207-213.
132. "Automatic flow system for the sequential determination of copper in serum and urine by flame atomic absorption spectrometry", C.M.P.V. Lopes, A.A. Almeida, J.L.M. Santos, J.L.F.C. Lima, *Anal. Chim. Acta*, (2006), 555(2), 370-376.
133. "Multiparametric flow system for the automated determination of sodium, potassium, calcium and magnesium in large-volume parenteral solutions and concentrated hemodialysis solutions", M.D. Piston, I. Knochen, *J. Autom. Methods Manage. Chem.*, (2006), 2006(3), 1-6.
134. "Multicommutated flow system employing pinch solenoid valves and micro-pumps - Spectrophotometric determination of paracetamol in pharmaceutical formulations", A.F. Lavorante, C.K. Pires, B.F. Reis, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, (2006), 42(4), 423-429.

135. "Automatic spectrophotometric procedure for the determination of tartaric acid in wine employing multicommutation flow analysis process", E.N. Fernandes, B.F. Reis, *Anal. Chim. Acta*, (2006), 557(1-2), 380-386.
136. "Instrumentation and automated photometric titration procedure for total acidity determination in red wine employing a multicommutated flow system", A.J.C. Garcia, B.F. Reis, *J. Autom. Methods Manage. Chem.*, (2006), 1-8.
137. "The potential of combining solid-phase optosensing and multicommutation principles for routine analyses of pharmaceuticals" J.F. García Reyes, E.J. Llorent Martinez , P. Ortega Barrales, A. Molina Diaz, *Talanta*, (2006), 68(5) 1482-1488.
138. "A versatile set up for implementing different flow analysis approaches: Spectrophotometric determination of nickel in steel alloys", J.A. Vieira, I.M. Raimundno, J.R. Jarbas, B.F. Boaventura, *Microchem. J.*, (2006), 82(1), 56-60.
139. "Automated sequential monitoring of ammonium, phosphate, and nitrite in wastewater by multi-commutated peristaltic and solenoid pumped flow system - a comparative study", E. Carrasco, J.A. Garcia Bautista, J.V.Garcia Mateo, *Chem. Anal. (Warsaw)*, (2007), 52(5), 757-770.
140. "Voltammetric determination of food colorants using a polyallylamine modified tubular electrode in a multicommutated flow system", M.L.S. Silva, M.B.Q. Garcia, J.L.F.C. Lima, E. Barrado, *Talanta*, (2007), 72(1), 282-288.
141. "A multicommutated stop-flow system employing LEDs-based photometer for the sequential determination of anionic and cationic surfactants in water", A.F. Lavorante, A. Morales Rubio, M. de la Guardia, B.F. Reis, *Anal. Chim. Acta*, (2007), 600(1-2), 58-65.
142. "Determination of piroxicam in pharmaceutical formulations combining amperometry and multicommutation", M. Luisa, S. Silva, M. Beatriz, Q. Garcia, J.L.F.C. Lima, E. Barrado, *Electroanalysis*, (2007), 19(13), 1362-1367.
143. "Multicommutated flow-through optosensors implemented with photochemically induced fluorescence: Determination of flufenamic acid" J. Lopez Flores, M. Cordova, A. Molina Diaz, *Anal. Biochem.*, (2007), 361(2), 280-286.
144. "An automatic falling drop system based on multicommutation process for photometric chlorine determination in bleach", S.D. Borges, B.F. Reis, *Anal. Chim. Acta*, (2007), 600(1-2), 66-71.
145. "A multicommutated flow-based system for hydrogen peroxide determination by chemiluminescence detection using a photodiode", O.D. Leite, O. Fatibello, H. J. Vieira, F. R. P. Rocha, N. S. de Miranda Cury, *Anal. Lett.*, (2007), 40(16-18), 3148-3157.

146. "Multicommutated fluorometric multiparameter sensor for simultaneous determination of naproxen and salicylic acid in biological fluids", J.F. Garcia Reyes, P. Ortega Barrales, A. Molina Diaz, *Anal. Sci.*, (2007), 23(4), 423-428.
147. "Micropumping multicommutation turbidimetric analysis of waters", E. Rodenas Torralba, A. Morales Rubio, A.F. Lavorante, B.F. Reis, M. de la Guardia, *Talanta*, (2007), 73(4), 742-747.
148. "A multisyringe flow-through sequential extraction system for on-line monitoring of orthophosphate in soils and sediments", J. Buanuam, M. Miro, E.H. Hansen, J. Shiowatana, J.M. Estela, V. Cerda, *Talanta*, (2007), 71(4), 1710-1719.
149. "A green flow-based procedure for fluorimetric determination of acid-dissociable cyanide in natural waters exploiting multicommutation", C.M.C. Infante, J.C. Masini, F.R.P. Rocha, *Anal. Bioanal. Chem.*, (2008), 391(8), 2931-2936.
150. "Determination of vinegar acidity by attenuated total reflectance infrared measurements through the use of second-order absorbance-pH matrices and parallel factor analysis", J. Moros, F. A. Inon, S. Garrigues, A. de la Guardia, *Talanta*, (2008), 74(4), 632-641.
151. "A multicommutated flow-system for spectrophotometric determination of tannin exploiting the Cu(I)/BCA complex formation", H.D. Moya, P. Dantoni, F.R.P Rocha, N. Coichev, *Microchem. J.*, (2008), 88(1), 21-25.
152. "Hydrodynamic sequential injection spectrophotometric system for determination of manganese in soil", S. Somnam, K. Grudpan, J. Jakmunee, *Spectrosc. Lett.*, (2008), 41(5), 221-227.
153. "Multicommutated flow system for the determination of glucose in honey with immobilized glucose oxidase reactor and spectrophotometric detection", A. Sixto, M.S. Knochen, *Talanta*, (2009), 77(4), 1534-1538.
154. "Peat as a natural solid-phase for copper preconcentration and determination in a multicommutated flow system coupled to flame atomic absorption spectrometry", A.P.S. Gonzales, M.A. Firmino, C.S. Nomura, F. R. P. Rocha, P.V. Oliveira, I. Gaubeur, *Anal. Chim. Acta*, (2009), 636(2), 198-204.
155. "Green Chemistry-Sensitive Analytical Procedure for Photometric Determination of Orthophosphate in River and Tap Water by Use of a Simple LED-Based Photometer", M.B. Silva, S.S Borges, S.R.W. Perdigo, B.F. Reis, *Spectrosc. Lett.*, (2009), 42(6-7), 356-362.

156. "Spectrophotometric flow determination of chlorine in water using a long pathlength optic cell and multicommutation", F.H. Salami, V.G. Bonifacio, O. Fatibello, L.H. Marcolino, *Quim. Nova*, (2009), 32(1), 112-115.
157. "Development of a Gas Diffusion Multicommutated Flow Injection System for the Determination of Sulfur Dioxide in Wines, Comparing Malachite Green and Pararosaniline Chemistries", S.M. Oliveira, T. Lopes, I.V. Toth, A. Rangel, *J. Agric. Food. Chem.*, (2009), 57(9), 3415-3422.
158. "Multicommutated flow system for ammonium and monochloramine determinations in wastewater and disinfection products", S.D. Borges, S.D., M. Acevedo, M. Korn, *Quim. Nova*, (2009), 32(5), 1175-1179.
159. "Development of an automated chemiluminescence flow-through sensor for the determination of 5-aminosalicylic acid in pharmaceuticals: a comparative study between sequential and multicommutated flow techniques", E.J. Llorent Martinez, P. Ortega-Barrales, M.L.F de Cordova, A. Ruiz Medina, *Anal. Bioanal. Chem.*, (2009), 394(3), 845-853.
160. "Determination of paracetamol using a flow injection analysis with multicommutation and chemiluminescence detection", G. G. Oliveira, B. C. Janegitz, M. B. Batistao, F. H. Salami, O. Fatibello, O. D. Leite, *Quim. Nova*, (2009) 32(7), 1755-1759.
161. "Sequential injection analysis for automation of the Winkler methodology, with real-time SIMPLEX optimization and shipboard application", B. Horstkotte, A. Tovar Sanchez, C. M. Duarte, V. Cerda, *Anal. Chim. Acta*, (2010), 658(2), 147-155.
162. "An environmentally friendly flow system for high-sensitivity spectrophotometric determination of free chlorine in natural waters", W.R. Melchert, D.R. Oliveira, F.R.P. Rocha, *Microchem. J.*, (2010), 96(1), 77-81.
163. "Automation of radiochemical analysis by applying flow techniques to environmental samples", Y. Fajardo, J. Avivar, L. Ferrer, E. Gomez, M. Casas, V. Cerdá, *TrAC Trends Anal. Chem.*, (2010), 29(11), 1399-1408.
164. "Multisyringe chromatography (MSC) using a monolithic column for the determination of sulphonated azo dyes", C. Fernandez, M. S. Larrechi, R. Forteza, V. Cerda, M.P. Callao, *Talanta*, (2010), 82(1), 137-142.
165. "Simultaneous Injection-Effective Mixing Analysis of Palladium", N. Teshima, D. Noguchi, Y. Joichi, N. Lenghor, N. Ohno, T. Sakai, S. Motomizu, *Anal. Sci.*, (2010), 26(2), 143-144.

166. "Highly sensitive CNT composite amperometric sensors integrated in an automated flow system for the determination of free chlorine in waters", R. Olivé Monllau, A. Pereira, J. Bartrolí, M. Baeza, F. Céspedes, *Talanta*, (2010), 81(4-5), 1593-1598.
167. "Monitoring of sulfonamides by a multicommutation flow-analysis assembly: use of quenching effect on terbium luminescence", L. Molina Garcia, E. J. Llorent Martinez, M. L. Fernandez de Cordova, A. RuizMedina, *Anal. Lett.*, (2010), 43(14), 2283-2295.
168. "A novel multicommutated fluorimetric optosensor for determination of resveratrol in beer", L. Molina-García, A. Ruiz Medina, M.L. Fernández de Córdoba, *Talanta*, (2011), 83(3), 850-856.
169. "An automatic optosensing device for the simultaneous determination of resveratrol and piceid in wines", L. Molina-García, A. Ruiz Medina, M.L.F. -de Córdoba, *Anal. Chim. Acta*, (2011), 689(2), 226-233.
170. "A membraneless gas-diffusion unit multisyringe flow injection spectrophotometric method for ammonium determination in untreated environmental samples", M.I.G.S. Almeida, J. Manuel Estela, M.A. Segundo, V. Cerda, *Talanta*, (2011) 84(5), 1244-1252.
171. "Lab on valve-multisyringe flow injection system (LOV-MSFIA) for fully automated uranium determination in environmental samples", J. Avivar, L. Ferrer, M. Casas, V. Cerdá, *Talanta*, (2011), 84(5), 1221-1227.
172. "An automated microfluidic colourimetric sensor applied in situ to determine nitrite concentration", A.D. Beaton, V.J. Sieben, C.F.A. Floquet, E.M. Waugh, S.A.K. Bey, I.R.G. Ogilvie, M.C. Mowlem, H.Morgan, *Sens. Actuators, B, Chem.*, (2011), 156(2), 1009-1014.
173. "Analysis of Bisphenol A in milk by using a multicommutated fluorimetric sensor", L. Molina García, M.L. Fernández de Córdoba, A. Ruiz Medina, *Talanta*, (2012), 96(0), 195-201.
174. "A monosegmented flow-batch system for slow reaction kinetics: Spectrophotometric determination of boron in plants", I.S. Barreto, S.E. Andrade, M.B. Lima, E.C. Silva, M.C.U. Araújo, L.F. Almeida, *Talanta*, (2012), 94(0), 111-115.
175. "Serum alkaline phosphatase assay with paired emitter detector diode", K. Strzelak, R. Koncki, L. Tymecki, *Talanta*, (2012), 96, 127-131.
176. "Automated total and radioactive strontium separation and preconcentration in samples of environmental interest exploiting a lab-on-valve system", R. Rodriguez, J. Avivar, L. Ferrer, L.O. Leal, V. Cerdá, *Talanta*, (2012), 96, 96-101.

177. "Automatized flow-batch method for fluorescent determination of free glycerol in biodiesel samples using on-line extraction", M.B. Lima, M. Insausti, C.E. Domini, M.F. Pistonesi, M.C. Ugolino de Araujo, B.S. Fernandez Band, *Talanta*, (2012), 89, 21-26.
178. "An environmentally friendly flow-based procedure with photo-induced oxidation for the spectrophotometric determination of chloride in urine and waters", D.L. Rocha, F.R.P. Rocha, *Microchem. J.*, (2013), 108(0), 193-197.
179. "Photochemical micro-digestion in a multi-pumping flow system for phosphorus fractionation in cereals", D.L. Rocha, F.R.P. Rocha, *Microchem. J.*, (2013), 109(0), 139-144.
180. "Determination of mercury in rice by MSFIA and cold vapour atomic fluorescence spectrometry", D.G. da Silva, L. A. Portugal, A.M. Serra, S.L.C. Ferreira, V. Cerdá, *Food Chem.*, (2013), 137(1-4), 159-163.
181. "Application of quantum dots in clinical and alimentary fields using multicommutated flow injection analysis", E.J. Llorent-Martínez, L. Molina-García, R. Kwiatkowski, A. Ruiz Medina, *Talanta*, (2013), 109(0), 203-208.
182. "Study of the quenching effect of quinolones over CdTe-quantum dots using sequential injection analysis and multicommutation", L. Molina García, E.J. Llorent Martínez, M.L. Fernández-de Córdova, J.L.M. Santos, S.S.M. Rodrigues, A. Ruiz Medina, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, (2013), 80(0), 147-154.
183. "A multi-pumping flow-based procedure with improved sensitivity for the spectrophotometric determination of acid-dissociable cyanide in natural waters", R.M. Frizzarin, F.R.P. Rocha, *Anal. Chim. Acta*, (2013), 758(0), 108-113.
184. "A flow-batch luminometer", R.A.N. Andrade, S.I.E. Andrade, V.L. Martins, P.N.T. Moreira, D. J.E. Costa, W.S. Lyra, M.C.U. Araújo, *Microchem. J.*, (2013), 108(0), 151-155.
185. "A digital image-based flow-batch analyzer for determining Al(III) and Cr(VI) in water", S.I.E. Andrade, M.B. Lima, I.S. Barreto, W.S. Lyra, L.F. Almeida, M.C.U. Araújo, E.C. Silva, *Microchem. J.*, (2013), 109(0), 106-111.
186. "Study of the quenching effect of quinolones over CdTe-quantum dots using sequential injection analysis and multicommutation", L. Molina-Garcia, E.J. Llorent Martinez, M.L. Fernandez de Cordova, J.L.N. Santos, S.S.M. Rodrigues, A. Ruiz Medina, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, (2013), 80, 147-154.
187. "Eco-friendly sonoluminescent determination of free glycerol in biodiesel samples", P.H.G.D. Diniz, M. Fabian Pistonesi, M.C.U. de Araujo, B.S. Fernandez Band, *Talanta*, (2013), 114, 38-42.

188. "A flow–batch luminometer", R.A. Andrade, S.I.E. Andrade, V.L. Martins, P.N.T. Moreira, D.J.E. Costa, W.S. Lyra, M.C.U. Araújo, *Microchem. J.*, (2013), 108, 151-155.
189. "A digital image-based flow-batch analyzer for determining Al(III) and Cr(VI) in wáter", S.I.E. Andrade, M.B. Lima, I.S. Barreto, W.S. Lyra, L.F. Almeida, M.C.U. Araújo, E.C. Silva, *Microchem. J.*, (2013), 109, 106-111.
190. "Green method based on a flow-batch analyzer system for the simultaneous determination of ciprofloxacin and dexamethasone in pharmaceuticals using a chemometric approach", M.F. Razuc, M. Grünhut, E. Saidman, M. Garrido, B. Fernández, *Talanta*, (2013), 115, 314-322.
191. "Liquid–liquid microextraction in a multicommutated flow system for direct spectrophotometric determination of iodine value in biodiesel", A.C. Pereira, F.R.P. Rocha, *Anal. Chim. Acta*, (2014), 829, 28-32.
192. "A multicommutated flow system for fast screening/sequential spectrophotometric determination of dichromate, salicylic acid, hydrogen peroxide and starch in milk samples", G.C.S. de Souza, P.A.B. da Silva, D.M. Leoterio, A.P.S. Paim, A.F. Lavorante, *Food Control*, (2014), 47, 127-135.
193. "Automation of ⁹⁹Tc extraction by LOV prior ICP-MS detection: application to environmental samples", R. Rodríguez, L. Leal, S. Miranda, L. Ferrer, J. Avivar, A. García, V. Cerdà, (2014), DOI: 10.1016/j.Talanta.2014.04.093.
194. "A thermostated electrochemical flow cell with a coupled bismuth film electrode for square-wave anodic stripping voltammetric determination of cadmium(II) and lead(II) in natural, wastewater and tap water samples", V.B Santos, E.L. Fava, N.S. de Miranda Curi, R.C. Faria, O. Fatibello Filho, *Talanta*, (2014), 126, 82-90.
195. "Multicommutated flow analysis system for determination of total protein in cerebrospinal fluid", K. Strzelak, A. Wiśniewska, D. Bobilewicz, R. Koncki, *Talanta*, (2014), 128, 38-43.
196. "A multicommutated flow system for fast screening/sequential spectrophotometric determination of dichromate, salicylic acid, hydrogen peroxide and starch in milk samples", G.C.S. de Souza, P.A. Bezerra da Silva, D. Leotério, M.S. Paim, A.P.S. Lavorante, F. André, *Food Control*, (2014), 46, 127-135.
197. "Environmentally friendly analytical chemistry through automation: comparative study of strategies for carbaryl determination with p-aminophenol", F. Reis, A. Morales Rubio, M. de la Guardia, *Anal. Chim. Acta*, (1999), 392(2–3), 265-272.

198. "New flow-multicommutation method for the photo-chemiluminometric determination of the carbamate pesticide asulam", A. Chivulescu, M. Catala Icardo, J. V. G. Mateo, J. M. Calatayud, *Anal. Chim. Acta*, (**2004**), 519(1), 113-120.
199. "Photochemical-chemiluminometric determination of aldicarb in a fully automated multicommutation based flow-assembly", M. Palomeque, J. A. G. Bautista, M. C. Icardo, J. V. G. Mateo, J. M. Calatayud, *Anal. Chim. Acta*, (**2004**), 512(1), 149-156.
200. "Rapid determination of diphenylamine residues in apples and pears with a single multicommutated fluorometric optosensor", J.F. Garcia-Reyes, P. Ortega Barrales, A. Molina Diaz, *J. Agric. Food. Chem.*, (**2005**), 53(26), 9874-9878.
201. "Flow-through sol-gel optical biosensor for the colorimetric determination of acetazolamide", P.C.A. Jeronimo, A. N. Araujo, M. Conceicao, B. S. M. Montenegro, D. Satinsky, P. Solich, *Analyst*, (**2005**), 130(8), 1190-1197.
202. "Analytical strategy photodegradation/chemiluminescence/continuous-flow multicommutation methodology for the determination of the herbicide Propanil", J.R. Albert-Garcia, M.C. Icardo, J.M. Calatayud, *Talanta*, (**2006**), 69(3), 608-614.
203. "Multi-commutated flow-through multi-optosensing: A tool for environmental analysis", E.J. Llorent Martinez, P. Ortega Barrales, A. Molina Diaz, *Spectr. Lett.*, (**2006**), 39(6), 619-629.
204. "Determination of thiabendazole residues in citrus fruits using a multicommutated fluorescence-based optosensor", J.F. Garcia-Reyes, E.J. Llorent Martinez, P. Ortega Barrales, A. Molina Diaz, *Anal. Chim. Acta*, (**2006**), 557(1-2), 95-100.
205. "Multicommutation-NIR determination of hexythiazox in pesticide formulations", J.F. Ventura Gayete, S. Armenta, S. Garrigues, A. Morales Rubio, M. de la Guardia, *Talanta*, (**2006**), 68(5), 1700-1706.
206. "A chemiluminescence flow-based procedure for determination of carbaryl in natural waters exploiting multicommutation and enzymatic reaction", C.K. Pires, A. Morales-Rubio, M. de la Guardia, J.L.F.C. Lima, E.A.G. Zagatto, B.F. Reis, *J. Brazilian Chem. Soc.*, (**2007**), 18(3), 519-525.
207. "Monitoring of the smoking process by multicommutation Fourier Transform Infrared spectroscopy", A.F. Lavorante, S. Garrigues, B. F. Reis, A. Morales Rubio, M. de la Guardia, *Anal. Chim. Acta*, (**2007**), 593(1), 39-45.

208. "Photo-induced chemiluminometric determination of karbutilate in a continuous-flow Multicommutation assembly", C. Amorim, J. R. Albert-Garcia, M.C.B.S. Montenegro, A.N. Araujo, J.M. Calatayud, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, (2007), 43(2), 421-427.
209. "Chemiluminometric photo-induced determination of Strychnine in a Multicommutation flow assembly", A.S.A. Ferreira, J.R. Albert Garcia, J.M. Calatayud, *Talanta*, (2007), 72(3), 1223-1229.
210. "Photo-induced fluorescence of fluometuron in a continuous-flow multicommutation assembly", I. Cydzik, J.R. Albert Garcia, J. Martinez Calatayud, *J. Fluoresc.*, (2007), 17(1), 29-36.
211. "Photo-induced chemiluminescence-based determination of diphenamid by using a multicommutated flow system", A. Czeseik, D. Lopez Malo, M.J. Duarte, L. Lahuerta Zamora, G.M. Anton Fos, J. Martinez Calatayud, *Talanta*, (2007), 73(4), 718-725.
212. "Photo-induced chemiluminometric determination of acrolein in a multicommutation flow assembly", T.G. Climent, J.R. Albert Garcia, J.M. Calatayud, *Anal. Lett.*, (2007), 40(4), 629-643.
213. "Determination of the herbicide benfuresate by its photo-induced chemiluminescence using flow multicommutation methodology", J.R. Albert Garcia, J.M. Calatayud, *Talanta*, (2008), 75(3), 717-724.
214. "Photo-induced chemiluminescence determination of the pesticide Buminafos by a Multicommutation flow-analysis assembly", D.L. Malo, J.M. Calatayud, *Talanta*, (2008), 77(2), 561-565.
215. "Automated Photo-Induced Fluorescence Determination of Flumetsulam", R.G. Medina, D.L. Malo, J.M. Calatayud, *Anal. Lett.*, (2009), 42(7), 958-972.
216. "A greener and highly sensitive flow-based procedure for carbaryl determination exploiting long pathlength spectrophotometry and photochemical waste degradation", W.R. Melchert, F.R.P. Rocha, *Talanta*, (2010), 81(1-2), 327-333.
217. "Automated optosensor for the determination of carbaryl residues in vegetable edible oils and table olive extracts", A. Ruiz Medina, E.J. Llorent-Martínez, M. L. Fernández de Córdoba, P. Ortega Barrales, *J. Food Comp. Anal.*, (2012), 26(1-2), 66-71.
218. "Solenoid pumps for Flow Injection Analysis", D.A. Weeks, S. Johnson, *Anal. Chem.*, (1996), 68, 2717-2719.

219. "Multi-pumping in flow analysis: concepts, instrumentation, potentialities" R.A.S. Lapa, J.L.F.C. Lima, B.F. Reis, J.L.M. Santos, E.A.G. Zagatto, *Anal. Chim. Acta*, (2002), 466(1), 125-132.
220. "Continuous flow versus stopped flow in a micro flow injection system", E.B. van Akker, M. Bos, A. van den Berg, W.E. van der Linden, *Micro Total Analysis Systems '98*, ed. D.J.V.A. Harrison. (2000), 335-338.
221. "Exploiting the oxidative coupling reaction of MBTH for indapamide determination", D.S.M. Ribeiro, J.A.V. Prior, J.L.M. Santos, J.A. Lopes, J.L.F.C. Lima, *Talanta*, (2009), 79(4), 1161-1168.
222. "Automatic Multipumping Flow System for Handling Viscous Solutions: Application to the Spectrophotometric Determination of Trimipramine", D. Ribeiro, J. Prior, J. Santos, J. Lima, *Anal. Lett.*, (2008), 41(14), 2684-2696.
223. "Automated Chemiluminometric Screening of Counterfeit Drugs of the Antituberculosis Agent Pyrazinamide", J.A.V. Prior, J.L.M. Santos, J. Lima, *J. AOAC Int.*, (2009), 92(3), 830-836.
224. "Spectrophotometric determination of phytic acid in plant extracts using a multi-pumping flow system", J.M.T Carneiro, E.A.G. Zagatto, J. L. M. Santos, J.L.F.C. Lima, *Anal. Chim. Acta*, (2002), 474(1-2), 161-166.
225. "Automated determination of diazepam in spiked alcoholic beverages associated with drug-facilitated crimes", D.S.M. Ribeiro, J.A.V. Prior, J.L.M. Santos, J.L.F.C. Lima, *Anal. Chim. Acta*, (2010), 668(1), 67-73.
226. "Multi-pumping flow system for spectrophotometric determination of bromhexine", A.C.B. Dias, J.L.M. Santos, J.L.F.C. Lima, E.A.G. Zagatto, *Anal. Chim. Acta*, (2003), 499(1-2), 107-113.
227. "Multi-pumping flow system for the spectrophotometric determination of dipyrone in pharmaceutical preparations", J. Lima, S.M.O. Sa, E.A.G. Zagatto, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, (2003), 32(4-5), 1011-1017.
228. "Spectrophotometric Determination of Thiocyanate in Human Saliva Employing Micropumping Multicommutation Flow System", J.J. Silva, M.A. Farias, V. L. Silva, M.C.B.S.M. Montenegro, A.N. Araujo, A.F. Lavorante, A.P.S. Paim, *Spectr. Lett.*, (2010), 43(3), 213-219.
229. "Diazepam Fluorimetric Monitoring Upon Photo-Degradation in an Automatic Miniaturized Flow System", D.S.M. Ribeiro, J.A.V. Prior, J.L.M. Santos, J.L.F.C. Lima, *J. Fluoresc.*, (2010), 20(4): p. 915-922.

230. "Multipumping flow system for improving hydride generation atomic fluorescence spectrometric determinations", I. Lopez Garcia, I. Ruiz Alcaraz, M. Hernandez Cordoba, *Spectrochim. Acta, Part B-At. Spectr.*, (2006), 61(3), 368-372.
231. "Fully automated spectrophotometric method for the determination of buspirone in pharmaceutical preparations", M.F.T. Ribeiro, J.L.M. Santos, J.L.F.C. Lima, A.C.B. Dias, Zagatto, E.A.G. *Anal. Lett.*, (2006), 39(11), 2243-2253.
232. "Evaluation of the total antioxidant capacity by using a multipumping flow system with chemiluminescent detection", S.R.P. Meneses, K.L. Marques, C.K. Pires, J.L.M. Santos, E. Fernandes, J.L.F.C Lima, E.A.G. Zagatto, *Anal. Biochem.*, (2005), 345(1), 90-95.
233. "Chemiluminometric evaluation of melatonin and selected melatonin precursors' interaction with reactive oxygen and nitrogen species", J. Harasimowicz, K.L. Marques, A.F.T.Silva, R.C.B. Costa, J.A.V. Prior, S.S.M. Rodrigues, J.L.M. Santos, *Anal. Biochem.*, (2012), 420(1), 1-6.
234. "Spectrophotometric sensor system based on a liquid waveguide capillary cell for the determination of titanium: Application to natural waters, sunscreens and a lake sediment", R. Pascoa, I.V. Toth, A.A. Almeida, A.O.S.S. Rangel, *Sens. Actuators, B-Chem.*, (2011), 157(1), 51-56.
235. "On-line analysis of volatile fatty acids in anaerobic treatment processes", E. Palacio Barco, F. Robert Peillard, J.L. Boudenne, B. Coulomb, *Anal. Chim. Acta*, (2010), 668(1), 74-79.
236. "CMOS arrays as chemiluminescence detectors on microfluidic devices", E. Rodrigues, E. R.A.S. Lapa, *Anal. Bioanal. Chem.*, (2010), 397(1), 381-388.
237. "Rapid chemiluminometric determination of gabapentin in pharmaceutical formulations exploiting pulsed-flow analysis", M. Manera, M. Miró, M.F.T. Ribeiro, J.M. Estelaa, V. Cerdá, J.L.M. Santos, J.L.F.C. Lima, *Luminescence*, (2009), 24(1), 10-14.
238. "Exploiting pulsed flows for heating improvement: application to determination of total reducing sugars in molasses and sugar-cane juices", E.R. Alves, M.A. Feres, E.A.G. Zagatto, J.L.F.C. Lima, *Curr. Anal. Chem.*, (2009), 5(1), 65-69.
239. "An expert flow system involving in-line prior assay for turbidimetric determination of chloride and sulphate in natural waters", P.R. Fortes, M.A. Feres, E.A.G. Zagatto, *Talanta*, (2008), 77(2): p. 571-575.

240. "Automated determination of uranium(VI) at ultra trace levels exploiting flow techniques and spectrophotometric detection using a liquid waveguide capillary cell", J. Avivar, L. Ferrer, M. Casas, V. Cerdá, *Anal. Bioanal. Chem.*, (2010), 397(2), 871-878.
241. "Ciprofloxacin and norfloxacin spectrophotometric determination in a fully automated multi-pumping flow system", M.H.R. Amorim, K.L. Marques, J.L.M. Santos, J.L.F.C. Lima, *Anal. Lett.*, (2011), 44(12), 2074-2084.
242. "Simultaneous chemiluminometric determination of levodopa and benserazide in a multi-pumping flow system with multivariate calibration", K.L. Marques, J.L. Santos, J.A. Lopes, J.L. Lima, *Anal. Sci.*, (2008), 24(8), 985-991.
243. "Chemiluminometric determination of carvedilol in a multi-pumping flow system", C.K. Pires, K.L. Marques, J.L.M. Santos, R.A.S. Lapa, J.L.F.C. Lima, E.A. Zagatto, *Talanta*, (2005), 68(2), 239-244.
244. "A catalytic multi-pumping flow system for the chemiluminometric determination of metformin", K.L. Marques, J.L.M. Santos, J. Lima, *Anal. Bioanal. Chem.*, (2005), 382(2), 452-457.
245. "Determination of ambroxol in an automated multi-pumping pulsed flow system", J.L.M. Santos, A. Clause, J.L.R.C. Lima, M.L.M.F.S. Saraiva, A.S. Rangel, *Anal. Sci.*, (2005), 21(4), 461-464.
246. "An improved sampling approach in multi-pumping flow systems applied to the spectrophotometric determination of glucose and fructose in syrups", J.M.T. Carneiro, A.C.B. Dias, E.A.G. Zagatto, J.L.M. Santos, J.L.F.C. Lima, *Anal. Chim. Acta*, (2005), 531(2) 279-284.
247. "Determination of phenylglyoxylic acid in urine using a multi-pumping flow system", K.L. Marques, S.S.M. Rodrigues, J.L.M. Santos, J.L.F.C. Lima, *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, (2011), 91(13), 1256-1266.
248. "Determination of phenols in waters using micro-pumped multicommutation and spectrophotometric detection: an automated alternative to the standard procedure", E. Rodenas-Torralba, A. Morales Rubio, M. de la Guardia, *Anal. Bioanal. Chem.*, (2005), 383(1), 138-144.
249. "A spectrophotometric flow procedure for the determination of cationic surfactants in natural waters using a solenoid micro-pump for fluid propulsion", A.F. Lavorante, K.C. Pires, A. Morales Rubio, M. de la Guardia, b.F. reis, *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, (2006), 86(10), 723-732.

250. "Multi-pumping flow system for the determination of dissolved orthophosphate and dissolved organic phosphorus in wastewater samples", C. Pons, I.V. Toth, A.O.S.S. Rangel, R. Forteza, V. Cerda, *Anal. Chim. Acta*, (2006), 572(1), 148-154.
251. "A multi-pumping flow system for chemiluminometric determination of ascorbic acid in powdered materials for preparation of fruit juices", C.K. Pires, A.F. Lavorante, L.M.T. Marconi, S.R.P. Meneses, E.A.G. Zagatto, *Microchem. J.*, (2006), 83(2), 70-74.
252. "Automatic flow system for the sequential determination of copper in serum and urine by flame atomic absorption spectrometry", C. Lopes, A.A. Almeida, J.L.M. Santos, J.L.F.C. Lima, *Anal. Chim. Acta*, (2006), 555(2), 370-376.
253. "Multipumping nitrite determination in exhaled breath condensate", E. Rodenas Torralba, A. Pelaez Hernandez, C. Morales Rubio, A. Morales Rubio, M. de la Guardia, *Spectr. Lett.*, (2006), 39(6), 683-697.
254. "Exploiting kinetic spectrophotometric determination of captopril, an angiotensin-converting enzyme inhibitor, in a multi-pumping flow system", J.A.V. Prior, J.L.M. Santos, J. Lima, *Anal. Chim. Acta*, (2007), 600(1-2): p. 183-187.
255. "Speciation of chromium in natural waters by micropumping multicommutated light emitting diode photometry", C.K. Pires, B.F. Reis, A. Morales Rubio, M. de la Guardia, *Talanta*, (2007), 72(4), 1370-1377.
256. "Effect of eluent composition and pH and chemiluminescent reagent pH on ion chromatographic selectivity and luminol-based chemiluminescence detection of Co^{2+} , Mn^{2+} and Fe^{2+} at trace levels", D. Badocco, P. Pastore, G. Favaro, C. Macca, *Talanta*, (2007), 72(1), 249-255.
257. "A multi-pumping flow system for chemiluminescent determination of ammonium in natural waters", K.L. Marques, C.K. Pires, J.L.M. Santos, E.A.G. Zagatto, J.L.F.C. Lima, *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, (2007), 87(2), 77-85.
258. "Application of pulsed flow analysis for chemiluminescent screening of fluoxetine counterfeit pharmaceuticals", K.L. Marques, J.L.M. Santos, J. Lima, *Anal. Lett.*, (2007), 40(11), 2241-2251.
259. "Development and critical comparison of greener flow procedures for nitrite determination in natural waters", W.R. Melchert, C.M.C. Infante, F.R.P. Rocha, *Microchem. J.*, (2007), 85(2), 209-213.
260. "An improved flow-based procedure for microdetermination of total tannins in beverages with minimized reagent consumption", C.M.C. Infante, V.R.B. Soares, M. Born, F.R.P. Rocha, *Microchim. Acta*, (2008), 161(1-2), 279-283.

261. "A multicommutated flow system with solenoid micro-pumps for paraquat determination in natural waters", C.M.C. Infante, A. Morales Rubio, M. de la Guardia, F.R.P. Rocha, *Talanta*, (2008), 75(5), 1376-1381.
262. "Multi-pumping flow system for the determination of nitrite and nitrate in water samples", C. Pons, J.L.M. Santos, J.L.F.C. Lima, R. Forteza, V. Cerda, *Microchim. Acta*, (2008), 161(1-2), 73-79.
263. "An improved procedure for flow-based turbidimetric sulphate determination based on a liquid core waveguide and pulsed flows", W.R. Melchert, F.R.P. Rocha, *Anal. Chim. Acta*, (2008), 616(1), 56-62.
264. "Multi-Pumping Mechanised Determination of Selenium in Natural Waters by Light Emitting Diode (LED) Spectrometry", R.N. Fernandes, B.F. Reis, A. Morales Rubio, M. de la Guardia, *J. Brazilian Chem. Soc.*, (2009), 20(7), 1242-1248.
265. "A flow-based procedure with solenoid micro-pumps for the spectrophotometric determination of uric acid in urine", D.L. Rocha, F.R.P. Rocha, *Microchem. J.*, (2010), 94(1), 53-59.
266. "A flow injection procedure based on solenoid micro-pumps for spectrophotometric determination of free glycerol in biodiesel", S.G. Silva, F.R.P. Rocha, *Talanta*, (2010), 83(2), 559-564.
267. "A greener and highly sensitive flow-based procedure for carbaryl determination exploiting long pathlength spectrophotometry and photochemical waste degradation", W.R. Melchert, F.R.P. Rocha, *Talanta*, (2010), 81(1-2), 327-333.
268. "Downscaling a multicommutated flow injection analysis system for the photometric determination of iodate in table salt", S.S. Borges, J.S. Peixoto, M.A. Feres, B.F. Reis, *Anal. Chim. Acta*, (2010), 668(1), 3-7.
269. "Applicability of cloud point extraction for the separation trace amount of lead ion in environmental and biological samples prior to determination by flame atomic absorption spectrometry", S.Z. Mohammadi, T. Shamspur, D. Afzali, Taher, M.A. Baghelani, M. Yar, *Arabian J. Chem.*, (2011), 1-6.
270. "Exploiting Mn(III)/EDTA complex in a flow system with solenoid micro-pumps coupled to long pathlength spectrophotometry for fast manganese determination", S.G. Silva, J.A. Nóbrega, F.R.P. Rocha, *Microchem. J.*, (2011), 98(1), 109-114.
271. "Cadmium telluride nanocrystals as luminescent sensitizers in flow analysis", P.R. Fortes, C. Frigerio, C.I.C. Silvestre, L.J.M. Santos, J.L.F.C. Lima, E.A.G. Zagatto, *Talanta*, (2011), 84(5): p. 1314-1317.

272. "A miniature and field-applicable multipumping flow analyzer for ammonium monitoring in seawater with fluorescence detection", B. Horstkotte, C.M. Duarte, V. Cerda, *Talanta*, (2011), 85(1): p. 380-385.
273. "Determination of glyphosate in water samples by multi-pumping flow system coupled to a liquid waveguide capillary cell", A.S. Silva, I.V. Toth, L. Pezza, H.R. Pezza, J.L.F.C. Lima, *Anal. Sci.*, (2011), 27(10), 1031-1036.
274. "Evaluation of acetylcysteine promoting effect on Cd-Te nanocrystals photoluminescence by using a multipumping flow system", C. Frigerio, V.L.R.G. Abreu, J.L.M. Santos, *Talanta*, (2012), 96, 55-61.
275. "The redox behaviour of diazepam (Valiums) using a disposable screen-printed sensor and its determination in drinks using a novel adsorptive stripping voltammetric assay", K.H. Church, A.H. Northall, S. Radbourne, O. Davies, S. Newman, J. Hartn, *Talanta*, (2013), 116, 300-307.
276. "Automatic multiple photodegradation unit on a multipumping flow system: Monitoring of ketoprofen", D.S.M. Ribeiro, K.L. Marques, J.L.M. Santos, J.A. Prior, *J. Photochem. Photobiol., A: Chem.*, (2013), 271(0), 77-84.
277. "A highly reproducible solenoid micropump system for the analysis of total inorganic carbon and ammonium using gas-diffusion with conductimetric detection", C. Henríquez, B. Horstkotte, V. Cerdá, *Talanta*, (2014), 118(0), 186-194.
278. "Evolution of the commutation concept associated with the development of flow analysis", E.A.G. Zagatto, B.C.C. Oliveira, R.P. Sartini, M.A.Z. Arruda, *Anal. Chim. Acta*, (1999), 400, 249-256.
279. "Multicommutation in flow analysis: concepts, applications and trends", F.B.R.P. Rocha, B.F. Reis, E.A.G. Zagatto, J.L.F.C. Lima, R.A.S. Lapa, J.L.M. Santos, *Anal. Chim. Acta*, (2002), 468(1), 119-131.
280. "Multi-pumping in flow analysis: concepts, instrumentation, potentialities", R.A.S. Lapa, J.L.F.C. Lima, B.F.B. Reis, J.L.M. Santos, E.A.G. Zagatto, *Anal. Chim. Acta*, (2002), 466(1), 125-132.
281. "Sampling strategies exploiting multi-pumping flow systems", J.A.V. Prior, J.L.M. Santos, J. Lima. *Anal. Bioanal. Chem.*, (2003), 375(8), 1234-1239.
282. "Multi-pumping flow systems: an automation tool", J. Lima, J.L.M. Santos, A.C.B. Dias, M.F.T. Ribeiro, E.A.G. Zagatto, *Talanta*, (2004), 64(5), 1091-1098.
283. "A multi-purpose flow system based on multi-commutation", F.R.P. Rocha, C.M.C. Infante, W.R. Melchert, *Spectrosc. Lett.*, (2006), 39(6), 651-668.

284. "Multi-pumping flow systems. The potential of simplicity", J.L.M. Santos, M.F.T. Ribeiro, A.C.B. Dias, J.L.F.C. Lima, E.E.A. Zagatto, *Anal. Chim. Acta*, (2007), 600(1-2), 21-28.
285. "A critical comparison of analytical flow systems exploiting streamlined and pulsed flows", A.C.B. Dias, J.L.M. Santos, J.L.F.C. Lima, C.M. Quintella, A.M.V. Lima, E.A.G. Zagatto, *Anal. Bioanal. Chem.*, (2007), 388(5-6), 1303-1310.
286. "Multi-commutation in flow analysis: Recent developments and applications", M.A. Feres, P.R. Fortes, E.A.G. Zagatto, J.L.M. Santos, J.L.F.C. Lima, *Anal. Chim. Acta*, (2008), 618(1): p. 1-17.
287. "Evidences of turbulent mixing in multi-pumping flow systems", P.R. Fortes, M.A. Feres, M.K. Sasaki, E.R. Alves, E.A.G. Zagatto, J.A.V. Prior, J.L.M. Santos, J.L.F.C. Lima, *Talanta*, (2009), 79(4), 978-983.
288. "Multi-commutation in spectrometry", A. Morales Rubio, B.F. dos Reis, M. de la Guardia, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, (2009), 28(7), 903-913.
289. "Flow techniques in water analysis", V. Cerda, J.M. Estela, R. Forteza, A. Cladera, E. Becerra, P. Altimira, P. Sitjar, *Talanta*, (1999), 50(4), 695-705.
290. "Application of flowing stream techniques to water analysis. Part I. Ionic species: dissolved inorganic carbon, nutrients and related compounds", M. Miro, J.M. Estela, V. Cerdá, *Talanta*, (2003), 60(5), 867-886.
291. "Application of flowing-stream techniques to water analysis - Part II. General quality parameters and anionic compounds: halogenated, sulphur and metalloid species", M. Miro, J.M. Estela, V. Cerdá, *Talanta*, (2004), 62(1), 1-15.
292. "Application of flowing stream techniques to water analysis Part III. Metal ions: alkaline and alkaline-earth metals, elemental and harmful transition metals, and multielemental analysis", M. Miro, J.M. Estela, V. Cerdá, *Talanta*, (2004), 63(2), 201-223.
293. "Multicommutated flow techniques for developing analytical methods", V. Cerdá, C. Pons, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, (2006), 25(3), 236-242.
294. "Flow analysis strategies to greener analytical chemistry. An overview", F.R.P. Rocha, J.A. Nobrega, O. Fatibello, *Green Chem.*, (2001), 3(5), 216-220.
295. "Bis(2,4-Dinitrophenyl) oxalate as a chemiluminescence reagent in determination of fluorescent compounds by plow-injection analysis", K. Honda, J. Sekino, K. Imai, *Anal. Chem.*, (1983), 55(6), 940-943.
296. "1,2-Dioxetanes –Novel chemiluminescent enzyme substrates- applications to immunoassays", I.B. Edwards, J.C. Voyta, *J. Biolumin. Chemilumin.*, (1989), 4(1), 99-111.

297. "Synthesis and properties of new luminescent acridinium-9-carboxylic acid-carboxylic acid- derivatives and their application in luminescence immunoassays (LIA)", T. Kinkel, H. Lubbers, E. Schmidt, P. Molz, H.j. Skrzypczyk, *J. Biolumin. Chemilumin*, (**1989**), 4(1), 136-139.
298. "Development of a novel multielement detection system por trace-metal determination based on chemiluminescence after separation by ion chromat"graphy", P. Jones, T. Williams, L. Ebdon,. *Anal. Chim. Acta*, (**1990**), 237(2), 291-298.
299. "Miniaturization of batch- and flow-type chemiluminescence detectors in capillary electrophoresis", K. Tsukagoshi, Y. Obata, R. Nakajima, *J. Chromatogr. A*, (**2002**), 971(1-2), 255-260.
300. "Measurement of gaseous hydrogen peroxide with a liquid core waveguide chemiluminescence detector", J.Z. Li, P.K. Dasgupta, *Anal. Chim. Acta*, (**2001**), 442(1), 63-70.
301. "Chemiluminescence detection in HPLC and CE for pharmaceutical and biomedical analysis", F.M. Li, C.H. Zhang, X.J. Guo, *Biomed. Chromatogr.*, (**2003**), 17(2-3), 96-105.
302. "Chemiluminescence in Analytical Chemistry", A.M. García Campaña, W.R.G. Baeyens, ed. Marcel Decker, New York, (**2001**).
303. "Analytical applications of the liquid-phase chemiluminescence", K. Robards, P.J. Worsfold, *Anal. Chim. Acta*, (**1992**), 266(2), 147-173.
304. "Analytical applications of liquid phase chemiluminescence reactions - A review", A.R. Bowie, M.G. Sanders, P.J. Worsfold, *J. Biolumin. Chemilumin.*, (**1996**), 11(2), 61-90.
305. "Applications of the luminol chemiluminescent reaction in analytical chemistry", C.A. Marquette, L.J. Blum, *Anal. Bioanal. Chem.*, (**2006**), 385(3), 546-554.
306. "Influence of water sample storage protocols in chemiluminescence detection of trace elements", Y. Moliner Martinez, S. Meseguer Lloret, L.A. Tortajada Genaro, P. Campins Falco, *Talanta*, (**2003**), 60(2-3) 257-268.
307. "Chemiluminescence microfluidic system sensor on a chip for determination of glucose in human serum with immobilized reagents", Y. Lv, Z.J. Zhang, F.A. Chen, *Talanta*, (**2003**), 59(3), 571-576.
308. "Flow injection analysis of uric acid with a uricase- and horseradish peroxidase-coupled Sepharose column based luminol chemiluminescence system", H.C. Hong, H.J. Huang, *Anal. Chim. Acta*, (**2003**), 499(1-2), 41-46.

309. "Reactivation of inactivated horseradish peroxidase with ethyleneurea and allantoin for determination of hydrogen peroxide by micro-flow injection horseradish peroxidase-catalyzed chemiluminescence", O. Nozaki, H. Kawamoto, *Anal. Chim. Acta*, (2003), 495(1-2): p. 233-238.
310. "Reagentless chemiluminescence biosensor for determination of hydrogen peroxide based on the immobilization of horseradish peroxidase on biocompatible chitosan membrane", G.J. Zhou, G. Wang, J.J. Xu, H.Y. Chen, *Sens. Actuators B-Chem.*, (2002), 81(2-3), 334-339.
311. "Flow-injection analysis of cobalt(II) utilizing enhanced lophine chemiluminescence with hydroxylammonium chloride", K. Nakashima, H. Yamasaki, R. Shimoda, N. Kuroda, S. Akiyama, W.R.G. Baeyens, *Biomed. Chromatogr.*, (1997), 11(2), 63-64.
312. "High-performance liquid-chromatographic determination of hydrogen-peroxide with peroxyoxalate chemiluminescence detection", K. Nakashima, M. Wada, N. Kuroda, S. Akiyama, K. Imai, *J. Liq. Chromatogr.*, (1994), 17(10), 2111-2126.
313. "Sub-picomol chemiluminescence detection of DNS-amino acids separated by high-performance liquid-chromatography with gradient elution", K. Miyaguchi, K. Honda, K. Imai, *J. Chromatogr.*, (1984), 303(1): p. 173-176.
314. "Temperature enhanced chemiluminescence for determination of cholesterol" J.H. Mike, T.J. Cleland, *Anal. Chim. Acta*, (1992), 259(1), 73-78.
315. "Continuous solid-phase extraction and dansylation of low-molecular-mass amines coupled on-line with liquid chromatography and peroxyoxalate chemiluminescence-based detection", M. Cobo, M. Silva, *J. Chromatogr. A*, (1999), 848(1-2), 105-115.
316. "Resolution of carboxylic-acid enantiomers by high-performance liquid-chromatography with peroxyoxalate chemiluminescence detection", T. Toyooka, M. Ishibashi, T. Terao, *J. Chromatogr.*, (1992), 627(1-2), 75-86.
317. "Evaluation of a tertiary amine labeling protocol for peptides and proteins using Ru(bpy)₃(3+)-based chemiluminescence detection", B.L. Waguespack, A. Lillquist, J.C. Townley, D.R. Bobbitt, *Anal. Chim. Acta*, (2001), 441(2), 231-241.
318. "Flow injection chemiluminescent method for the successive determination of L-cysteine and L-cystine using photogenerated tris(2,2'-bipyridyl) ruthenium (III)", T. Perez Ruiz, C. Martinez Lozano, V. Tomas, J. Martin, *Talanta*, (2002), 58(5), 987-994.

319. "Determination of codeine in process streams using flow-injection analysis with chemiluminescence detection", N.W. Barnett, T.A. Bowser, R.D. Gerardi, B. Smith, *Anal. Chim. Acta*, (1996), 318(3), 309-317.
320. "Tris(2,2-bipyridyl)ruthenium (II) chemiluminescence in a microflow injection system for codeine determination", G.M. Greenway, L.J. Nelstrop, S.N. Port, *Anal. Chim. Acta*, (2000), 405(1-2), 43-50.
321. "Determination of sodium oxalate in Bayer liquor using flow-analysis incorporating an anion exchange column and tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II) chemiluminescence detection. N.W. Barnett, S.W.Lewis, S.D. Purcell, P. Jones, *Anal. Chim. Acta*, (2002), 458(2), 291-296.
322. "A direct chemiluminescence method for the determination of nucleic acids using Ru(phen)₃²⁺-Ce(IV) system", H.Y. Han, Z.K. He, E.E. Zeng, *Fresenius J. Anal. Chem.*, (1999), 364(8), 782-785.
323. "A chemiluminescence method for the analysis of H₂O₂ in natural waters", W.J. Cooper, J.K. Moegling, R.J. Kieber, J.J. Kiddle, *Mar. Chem.*, (2000), 70(1-3), 191-200.
324. "Flow-injection immunoassays with acridinium ester-based chemiluminescence detection", C. Shellum, G. Gubitz, *Anal. Chim. Acta*, (1989), 227(1), 97-107.
325. "Evaluation of as chemiluminescent DNA probe assay for the rapid confirmation of listeria-monocytogenes", O. Okwumabua, B. Swaminathan, P. Edmonds, J. Wenger, J. Hogan, M. Alden, *Res. Microbiol.*, (1992), 143(2), 183-189.
326. "A new, sensitive a simple method for HLA class II DNA typing: sequence specific oligonucleotide probe RNA hybridization K. Matsubara, S.T. Iwaki, J. Ciccirelli, S. Musa, J. Garcia Gomez, *Human Immunology*, (1995), 44, 37.
327. "Analytical applications of acidic potassium permanganate as a chemiluminescence reagent", B.J. Hindson, N.W. Barnett, *Anal. Chim. Acta*, (2001), 445(1), 1-19.
328. "Selective determination of amino acids using flow injection analysis coupled with chemiluminescence detection", J.W. Costin, P.S. Francis, S.W. Lewis, *Anal. Chim. Acta*, (2003), 480(1): p. 67-77.
329. "Flow-injection chemiluminescence determination of ascorbic acid by use of the cerium(IV)-Rhodamine B system", Y.J. Ma, M. Zhou, *Anal. Chim. Acta*, (2002), 464(2), 289-293.
330. "Flow-injection chemiluminescent determination of nitrite in water based on the formation of peroxyxynitrite from the reaction of nitrite and hydrogen peroxide", C. Lu, F. Qu. J.M. Ling, *Anal. Chim. Acta*, (2002), 474(1-2), 107-114.

331. "Determination of tetracycline by flow injection with luminescence detection", A.A. Alwarthan, A. Townshend, *Anal. Chim. Acta*, (**1988**), 205(1-2): p. 261-265.
332. "Detection of Escherichia coli O157 : H7 using immunomagnetic capture and luciferin-luciferase ATP measurement", S.I. Tu, D. Patterson, J. Uknalis, P. Irwin, *Food Research International*, (**2000**), 33(5), 375-380.
333. "Simplified method for estimation of microbial activity in compost by ATP analysis", J.I. Horiuchi, K. Ebie, K. Tada, M. Kobayashi, T. Kanno, *Bioresour.Technol.*, (**2003**), 86(1), 95-98.
334. "Propolis extract release evaluation from topical formulations by chemiluminescence and HPLC", F.D. Marquele, A.R.M. Oliveira, P.S. Bonato, M.G. Lara, M.J. Fonseca, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, (**2006**), 41(2), 461-468.
335. "Spectrochemical Analysis", J.D.C. Ingle, S.R. Crouch, ed. P. Hall. (**1988**), New Jersey.
336. "The book of Photon Tools", Z.B. Drozdowicz, Oriel Instruments, (**1999**), USA.
337. "Sources and applications of ultraviolet radiation", R. Phillips, Academic Press Inc., (**1983**), New York.
338. "Chemiluminescence determination of carbofuran and promecarb by flow injection analysis using two photochemical reactions", T. Perez-Ruiz, C. Martínez Lozano, T. Martin, *Analytst*, (**2002**), 127(11), 1526-1530.
339. "Flow-injection spectrophotometric determination of ferbam based on a photochemical reaction", T. Pérez Ruiz M.L.C., Tomas, A. Sanz, R. Garre, *Microchem. Acta*, (**2003**), 142(4), 231.
340. "Flow injection chemiluminescence determination of carbaryl using photolytic decomposition and photogenerated tris (2,2'-bipyridyl)ruthenium(III)", T. Perez Ruiz, C.M. Lozano, V. Tomas, J. Martin, *Anal. Chim. Acta*, (**2003**), 476(1), 141-148.
341. "Determination of a N-methylcarbamate pesticide in environmental samples based on the application of photodescomposition and peroxyoxalate chemiluminescence detection", J.J. Soto Chinchilla, L. Gámiz García, L. Cuadros Rodríguez, J.L. Martínez Vidal. *Anal. Chim. Acta*, (**2004**), 524(1-2), 235.
342. "A fully automates assembly using solenoid valves for the photodegradation and chemiluminometric determination of the herbicide chlorsulfuron", K. Mervartova J.M. Calatayud, M.C. Icardo, *Anal. Lett.*, (**2005**), 38(1), 179.

343. "Chemiluminescence determination of the pesticide bromoxynil by on-line photodegradation in a flow-injection system", Z. Pawlicova, I. Sahuquillo, J.V. García Mateo, M.C. Catala Icardo, J. Martínez Calatayud, *Anal. Sci.*, **(2006)**, 22, 29.
344. "Flow injection-photoinduced-chemiluminescence determination of ziram and zineb", J.L.L. Paz, M. Catalá Icardo, *Anal. Chim. Acta*, **(2008)**, 625(2), 173-179.
345. "Ciencias Farmacéuticas, del Amuleto al Ordenador. Del Azar al Diseño: Estrategias contra la Enfermedad", J. Martínez Calatayud (coordinador), J. Gálvez Álvarez, A. Laguna Platero, B. Silvestre Navarro, P. Vernia Martínez, ed. Fundación Universitaria San Pablo, Moncadad, España, **(1998)**, 107-121.
346. "Molecular connectivity as a relevant new tool for predicting analytical behavior: A survey of chemiluminescence and chromatography", M.C. Catalá Icardo, L. Lahuerta Zamora, G.M. Antón-Fos, J. Martínez Calatayud, M.J. Duart, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, **(2005)**, 24(8), 782-791.
347. "Application of the new atomic theory to the graphical representation of the invariants and covariants to the binary quantics", J.J. Sylvester, *Am. J. Math.*, **(1874)**, 1, 64-83.
348. "Structural determination of paraffin boiling points", H. Wiener, *J. Am. Chem. Soc.*, **(1947)**, 69, 17-20.
349. "Correlation of heats of isomerization and differences in heats of vaporization of isomers among the paraffin hydrocarbons", H. Wiener, *J. Am. Chem. Soc.*, **(1947)**, 69, 2636-2638.
350. "Nonrandom polycondensation: statistical theory of the substitution effect", M. Gordon, G. R. Scantlebury, **(1964)**, *Trans. Faraday Soc.*, 60, 604-621.
351. "Topological index. A newly proposed quantity characterizing the topological nature of structural isomers of saturated hydrocarbons", H. Hosoya, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **(1971)**, 44, 2332-2339.
352. "Applications of graph theory in chemistry", A.T. Balaban, *J. Chem. Inf. Comput. Sc.*, **(1985)**, 25, 334-343.
353. "On characterization of molecular branching", M. Randic, *J. Am. Chem. Soc.*, **(1975)**, 97, 6609-6615.
354. "Theoretic Information indices for characterization of chemical structures", D. Bonchev, *Research Studies*, **(1983)**.
355. "Comparison of several molecular topological indices with molecular surface area in aqueous solubility estimation", G.A. Amidon, S.T. Anik, *J. Pharm. Sci.*, **(1975)**, 801-806.

356. "Molecular Connectivity I: Relationship to non-specific anesthesia", L.H. Kier, L.H. Murray, W.J. Randic, *J. Pharm. Sci.*, (1974), 64, 1971-1974.
357. "On characterization of molecular branching", M. Randic, *J. Am. Chem. Soc.*, (1975), 6609-6615.
358. "Desmol 11 Software", R. Garcia Domenech, ed. Unidad de investigación Diseño de Fármacos y Conectividad Molecular, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, (2000), España.
359. "Desmol13 Software", ed. Unidad de Investigación de Diseño de Fármacos y Conectividad Molecular, Facultad de Farmacia, Universitat de Valencia, (2000), España.
360. "MOLCONN-Z software", L.H. Hall, Eastern Nazarene College, Quincy, Massachusetts, (1995), USA.
361. "BMDP Statistical software Manual", W.B. Dixon, MB. Engelman, L. Jennrich, ed. California Press, (1990), Vol. 1. 339-358, Berkeley.
362. "Pharmacological distribution diagrams: a tool for de novo drug desing", J. Gálvez, R.Garcia Domenech, J.V. de Julián Ortiz, L. Popa, *J. Mol.Graph.*, (1996), 14, 272-276.
363. "Application de la topologie moléculaire à la prédiction de la viscosité liquide des composés organiques", R. García Domenech, J. Gálvez, R. Gozalbes, *J. Chim. Phys.*, (1999), 96(7), 1172-1185
364. "Estimation of the solubility of sulfonamides in aqueous media from partition coefficients and entropies of fusion", F. Martínez, A. Garcia, *Phys. Chem. Liq.*, (2002), 40(4) 411-420.,
365. "Five different fluxional processes in polyfluorophenyl palladium(II) complexes with 2,4,6-Tris(3,5-dimethylpyrazol-1-yl)-1,3,5-triazine. The driving effect of the solvent", M.C. Carrión, A.García, F.A. Jalón, B.R. Manzano, A. Delahoz, R.M. Claramunt, V. Milata, J. Elguero, *Inorg. Chem.*, (2003), 42(3), 885-895.
366. "A new topological index to elucidate apolar hydrocarbons", F. Torrens, *J. Comp. Aided Mol. Des.*, (2001), 15, 709-719.
367. "Topological index and thermodynamic properties. 5. How can we explain the topological dependency of thermodynamic properties of alkanes with the topology of graphs", H. Hosoya, M.García, M. Murakami, S. Ikeda, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, (1999), 39(2), 192-196.
368. "Virtual combinatorial syntheses and computational screening of new potential anti-herpes compounds ", J.V. Julián Ortiz, J.García, C. Muñoz Collado, R. García Domenech, J. Gimeno Cardona, *J. Med. Chem.*, (1999), 42(17), 3308-3314.

369. "General topological patterns of known drugs", J. Gálvez, J.V.de Julián Ortiz, R. García Domenech, *J. Mol. Graph. Model.*, (2001), 20(1), 84-94.
370. "Molecular connectivity to find betablockers with low toxicity", R. García Domenech, C. de Gregorio, J.V. de Julián Ortiz, J. Gálvez, L. Popa, *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, (1997), 7, 567-572.
371. "New Analgesics Designed by Molecular Topology", R. García Domenech, F.J.García March, R.M. Soler Roca, J. Gálvez Álvarez, G.M. Antón Fos, J.V. de Julián Ortiz, *Quant. Struct. Act. Relat.*, (1996), 15(3), 201-207.
372. "Topological modelling of analgesia" K.C. Mathur, S.Garcia, P.V. Khadikar, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, (2003), 11(8), 1915-1928.
373. "New bronchodilators selected by molecular topology", Ríos Santamaría, R.García Domenech, J. Gálvez, *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, (1998), 8, 477-482.
374. "New bronchodilators selected by molecular topology", I, Ríos Santamaria, R. García Domenech, J. Gálvez, J. Cortijo, P. Santamaría, E. Morcillo, *Internet Electron. J. Mol. Design*, (2002), 1, 339-350.
375. "Designing sedative/hypnotic compounds from a novel substructural graph-theoretical approach", E. Estrada, P. Peña, R. García Domenech, *J. Comput. Aid. Mol. Des.*, (1998), 12, 583-595.
376. "QSAR by molecular topology of 2,4-dihydroxythiobenzanilides. A virtual screening approach to optimize the antifungal activity", R. García Domenech, A. García García, A. Soriano, V. Pérez Mondejar, J. Gálvez, *Int. J. Chem. B*, (2002), 41, 2376-2384.
377. "Molecular search of new active drugs against toxoplasma gondii", R. Gozalbes, J.García, R. García Domenech, *SAR. QSAR. Environ. Res.*, (1999), 10, 47-60.
378. "Search compounds with antibacterial activity by applying molecular topology to selected quinolones", S. Mut Ronda, M.T.Salavert Salvador, M.J. Duart, G.M. Antón Fos, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, (2003), 13, 2699-2702.
379. "Optimization of a mathematical pattern for the prediction of antihistaminic activity", M.J. Duart, R.García Domenech, G.M. Antón Fos, J. Gálvez, *J. Compt. Aid. Mol. Des.*, (2001), 15, 561-572.
380. "New hipoglycaemic agents selected by molecular topology", C. Calabuig, G.M.Antón Fos, J. Gálvez, R. García Domenech, *Int. J. Phar.*, (2004), 278, 111-118.
381. "Data mining for seeking accurate quantitative relationship between molecular structure and GC retention indices of alkanes by projection pursuit", Y. Du, Y. Liang, *Comput. Biol. Chem.*, (2003), 27(3), 339-353.

382. "Theoretical prediction of the chemiluminescence behaviour of the ergot alkaloids: Direct flow injection chemiluminescence determination of ergotamine tartrate", E. Polo Martí, M.C. Catalá Icardo, L. Lahuerta Zamora, G.M. Antón Fos, J. Martínez Calatayud, *Anal. Chim. Acta*, (2004), 527(2), 177-186.
383. "Use of QSAR methods for predicting the chemiluminescent behaviour of organic compounds upon reaction with potassium permanganate in an acid medium", M.J. Duart, G.M. Antón Fos, L. Lahuerta Zamora, J. Martínez Calatayud, *Talanta*, (2009), 79(3), 905-910.
384. "Theoretical prediction of the native fluorescence of pharmaceuticals", J.R. Albert Garcia, G.M. Antón Fos, M.J. Duart, L. Lahuerta Zamora, J. Martínez Calatayud, *Talanta*, (2009), 79(2), 412-418.
385. "Reagent-less electrogenerated chemiluminescence peptide-based biosensor for the determination of prostate-specific antigen", H. Qi, C. Wang, X. Qiu, Q. Gao, C. Zhang, *Talanta*, (2012), 100(0), 162-167.
386. "Prediction of the chemiluminescent behaviour of phenols and polyphenols", B. Gómez Taylor Corominas, G.M. Antón Fos, J.V. García Mateo, L. Lahuerta Zamora, J. Martínez Calatayud, *Talanta*, (2003), 60(2-3), 623-628.
387. "Photo-induced chemiluminescence-based determination of diphenamid by using a multicommutated flow system", A. Czescik, D. López Malo, M.J. Duart, L. Lahuerta Zamora, G.M. Antón Fos, J. Martínez Calatayud, *Talanta*, (2007), 73(4), 718-725.
388. "Theoretical prediction of the photoinduced chemiluminescence of pesticides", I.S. Ricart, G.M. Anton Fos, M.J. Duart, J.V.G. Mateo, L.L. Zamora, J.M. Calatayud, *Talanta*, (2007), 72(2), 378-386.
389. "MOLCONN-Z software version 3.0", L.H. Hall, ed. Eastern Nazarene College, Quincy, Massachusetts, USA, (1995).
390. "Environmental Chemistry", Baird, C., *Second Edition*. Ed. W.H. Freeman and Company, New York, (1995), 509-510.
391. "The photo-Fenton oxidation- a cheap and efficient wastewater treatment method", R. Bauer, H. Fallmann, *Res. Chem. Intermed.*, (1997), 23, 341-354.
392. "Degradation of selected pesticide active ingredients and commercial formulations in water by the photo-assisted Fenton reaction", P.L. Huston, J.J. Pignatello, *Water Res.*, (1999), 33(5), 1238-1246.

393. "Iron (III) aquacomplexes as effective photocatalysts for the degradation of pesticides in homogeneous aqueous solutions", C. Catastini, M. Sarakha, G. Mailhot, M. Bolte M, *Sci Total Environ*, (2002), 298(1-3), 219-228.
394. "Chemically induced phosphorescence from manganese(II) during the oxidation of various compounds by manganese(III), (IV) break and (VII) in acidic aqueous solutions", N.W. Barnett, B.J. Hindson, P. Jones, T.A. Smith, *Anal. Chim. Acta*, (2002), 451(2), 181-188.
395. "FI-chemiluminometric determination of thiazides by on-line photochemical reaction", M. Ciborowski, J.V. García Mateo, J. Martínez Calatayud., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, (2004), 36, 693-700.
396. "Enhanced flow injection-chemiluminescence determination of sulphonamides by on-line photochemical reaction" M. Catalá Icardo, J.V. García Mateo, M. Fernández Lozano, J. Martínez Calatayud, *Anal. Chim. Acta*, (2003), 499, 57-69.
397. "Flow injection chemiluminescent determination of thiamine in pharmaceutical samples by on-line photodegradation", A. Wasieleczuk, J.V. García Mateo, J. Martínez Calatayud, *Anal. Lett.*, (2004), 37(15), 3205-3218.
398. "Flow-injection analysis study of the chemiluminescent behaviour of proflavine and acriflavine", O. Rubio Pons, M. Catalá Icardo, J.V. García Mateo, J. Martínez Calatayud, *Anal. Chim. Acta*, (2001), 438, 149-156.
399. "Determination of melamine by flow injection analysis based on chemiluminescence system", R. Yang, Q.W. Wang, J.J. Li, L.B. Qu, H.J. Zeng, *Food Chem.*, (2011), 127(2), 842-846.
400. "Chemiluminometric determination of the pesticide pirimicarb by a flow injection analysis assembly", A.N. Diaz, V. Bracho, M. Algarra, F. Sanchez, *Anal. Lett*, (2008), 41(17), 3210-3220.
401. "Trace-level detection of atrazine using immuno-chemiluminescence: dipstick and automated flow injection analysis formats", R.S. Chouhan, K.V.S. Rana, C.R. Suri, R.K. Thampi, M.S. Thakur, *J. AOAC Int.*, (2010), 93(1), 28-35.
402. "Determination of monocrotophos pesticide by flow injection chemiluminescence method using luminol-hydrogen peroxide system", J.X. Du, X. Liu, J.R. Lu, *Anal. Lett.*, (2003), 36(5), 1029-1038.
403. "Pirsidomine, a novel nitric-oxide donor, suppresses ischemic arrhythmias in anesthetized pigs", C.L. Wainwright, P.A. Martorana, *J. of Cardiovasc. Pharmacol.*, (1993), 22, S44-S50.

404. "Nano-anatase-enhanced peroxyoxalate chemiluminescence and its sensing application", L. Yang, G.J. Guan, S.H. Wang, Z.P. Zhang, *J. Phys.Chem. C*, **(2012)**, 116(5), 3356-3362.
405. "Determination of phenolic herbicides in soil by peroxyoxalate chemiluminescence", M.A. Abubaker, R.V. Wandruszka, *Anal. Lett.*, **(1991)**, 24(1), 93-102.
406. "Determination of thiram and aminocarb pesticides in natural water samples using flow injection with tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II)-diperiodatoargentate(III) chemiluminescence detection", M. Asghar, M. Yaqoob, N. Haque, A. Nabi, *Anal. Sci.*, **(2013)**, 29(11), 1061-1066.
407. "A simple and rapid screening method for glyphosate in water using flow-injection with electrochemiluminescence detection", H.Y. Chuang, T.P. Hong, C.W. Whang, *Anal. Methods*, **(2013)**, 5(21), 6186-6191.
408. "Chemiluminescence switching on peroxidase-like Fe(3)O(4) nanoparticles for selective detection and simultaneous determination of various pesticides", G. Guan, L. Yang, Q. Mei, K. Zhang, Z. Zhang, M.Y. Han, *Anal. Chem.*, **(2012)**, 84(21), 9492-9497.
409. "Sensitive chemiluminescent immunoassay of triclopyr by digital image analysis", A.N. Diaz, F.G. Sanchez, E.N. Baro, A.F.G. Diaz, A. Aguilar, M. Algarra, *Talanta*, **(2012)**, 97, 42-47.
410. "Molecular connectivity. 7. Specific treatment of heteroatoms", L.B. Kier, L.H. Hall, *J. Pharm. Sci.*, **(1976)**, 65(12), 1806-1809.
411. "Charge indexes-new topological descriptors", J. Gálvez, R. Garcia, M.T. Salabert, R. Soler, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, **(1994)**, 34(3), 520-525.
412. "The E-state as an extended free valence", L.B Kier, L.H. Hall, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, **(1997)**, 37(3), 548-552.
413. "Molecular structure description: The electrotopological state", L.H. Hall, L.B. Kier, *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, **(1999)**, 217, U701-U701.
414. "A shape index from molecular graphs", L.B. Kier, *Quant. Struct.-Act. Relat.*, **(1985)**, 4(3), 109-116.
415. "Topological approach to drug design", J. Galvez, R. Garcia Domenech, J.V. Dejulianortiz, R. Soler, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, **(1995)**, 35(2), 272-284.
416. "The imidazolinone herbicides: An overview of bioavailability in soil", G. Tuxhorn, J. Deane, D. Shaner, *15th World Congress of Soil Science*, Vol 3a, Transactions: Commission Ii: Symposia, **(1994)**, 200-209.

417. "Determination of imazethapyr and imazapyr residues in soil by coupled-column liquid-chromatography", O. Novakova, *Chromatogr.*, (1994), 39(1-2) 62-66.
418. "Simultaneous determination of imidazolinone herbicides from soil and natural waters using soil column extraction and off-line solid-phase extraction followed by liquid chromatography with UV detection or liquid chromatography electrospray mass spectroscopy", A. Lagana, C. Fago, A. Marino, *Anal. Chem.*, (1998) 70(1), 121-130.
419. "Determination of imazaquin residues in soil by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography", X. Chen, J. Hu, J. Li, *J. AOAC Int.*, (2007), 90(2), 568-574.
420. "Optimization of high performance liquid chromatography mass spectrometry apparatus for determination of imidazolinone herbicides in soil at levels of a few PPB", G. D'Ascenzo, A. Gentili, S. Marchese, A. Marino, D. Perret, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, (1998), 12(19), 1359-1365.
421. "High-performance liquid chromatographic separation of imidazolinone herbicide enantiomers and their methyl derivatives on polysaccharide-coated chiral stationary phases", W.J. Lao, J. Gan, *J. Chromatogr. A*, (2006), 1117(2), 184-193.
422. "Rapid determination of imazapyr in corn by gas chromatography mass spectrometry with electron capture negative ion chemical ionization", S.J. Stout, A.R. DaCunha, J. S. Fletcher, G.L. Picard, *J. AOAC Int.*, (1996), 79(5), 1220-1225.
423. "Reusable fiber optic immunosensor for rapid detection of imazethapyr herbicide", N.A. Anis, M.E. Eldefrawi, R.B. Wong, *J. Agric. Food. Chem.*, (1993), 41(5), 843-848.
424. "Reusable fiber optic immunosensor for rapid detection of imazethapyr herbicide", N.A. Anis, M.E. Eldefrawi, R.B. Wong, *Anal. Chim. Acta*, (1993), 279(1), 141-147.
425. "Photolysis of imidazolinone herbicides in aqueous-solution and on soil", W.S: Curran, M.M. Loux, R.A. Liebl, F.W. Simmons, *Weed Science*, (1992), 40(1), 143-148.
426. "Hydrolytic and photolytic behaviour of imidazolinone pesticides. Case of imazamox and imazapyr", E.F. Quivet, R. Georges, J. Paise, *ACTUAL CHIMIQUE*, (2006), 294, 31-34.

427. "Abiotic degradation (photodegradation and hydrolysis) of imidazolinone herbicides", M. Ramezani, D.P. Oliver, R.S. Kookana, G. Gill, C. Preston, *J. Environ. Sci. Health., Part B*, (2008), 43(2), 105-112.
428. "Analysis of pesticides by flow injection coupled with chemiluminescent detection: A review", J.L. Lopez Paz, M. Catala Icardo, *Anal. Lett.*, (2011), 44(1-3), 146-175.
429. "Photo-induced luminescence", M.C. Icardo, J.M. Calatayud, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, (2008), 38(2), 118-130.
430. "Analytical applications of photoinduced chemiluminescence in flow systems-A review", F.J. Lara, A.M. García Campaña, J.J. Aaron, *Anal. Chim. Acta*, (2010), 679(1-2), 17-30.
431. "Photolysis of imazapyr (AC-243997) herbicide in aqueous media", N.M. Mallipudi, S.J. Stout, A.R. Dacunha, A.H. Lee, *J. Agric. Food. Chem.*, (1991), 39(2), 412-417.
432. "Photochemical degradation of imazamox in aqueous solution: Influence of metal ions and anionic species on the ultraviolet photolysis", P. Quivet, R. Faure, J. Georges, J.O. Paise, B. Herbreteau, E. Lanteri, *J. Agric. Food. Chem.*, (2006), 54(10), 3641-3645.
433. "Flow injection determination of lactate based on a photochemical reaction using photometric and chemiluminescence detection", T. Perez Ruiz, C. Martinez Lozano, v. Tomas, J. Martin, *Analyst*, (1999), 124(10), 1517-1521.
434. "Use of surfactants to improve analytical performance of lucigenin chemiluminescence", L.L. Klopff, T.A. Nieman, *Anal. Chem.*, (1984), 56(8), 1539-1542.
435. "Chemiluminescence determination of tiopronin by flow injection analysis based on cerium(IV) oxidation sensitized by quinine", Y.N. Zhao, W.R.G. Baeyens, X.R. Zhang, A.C. Calokerinos, K. Nakashima, G. VanDerWeken, *Analyst*, (1997), 122(2), 103-106.
436. "Copper(II) complexes of imidazolinone herbicides", L.S. Erre, E. Garribba, G. Micera, A. Pusino, D. Sanna, *Inorg. Chim. Acta*, (1997), 255(2), 215-220.
437. "Copper(II) complexes of the imidazolinone herbicide imazapyr", A.M. Duda, M. Dyba, H. Kozlowski, G. Micera, A. Pusino, *J. Agric. Food. Chem.*, (1996), 44(11), 3698-3702.
438. "Plant Growth Substances Principles and Applications2", R.N. Arteca, Editorial Chapman and Hall New York, (1996).
439. "Fisiologia Vegetal", F. Salisbury (1994), Ed. Iberoamericana, 759.

440. "Control hormonal de l desarrollo de las plantas: fisiología, experimentación" R.Y. Ramirez, (1993), Limusa.
441. "Plant Physiology", Z. Taiz, (2006), Ed. Sinauer. New york.
442. "A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria", E. Glickmann, Y. Dessaux, *Appl. Environ. Microbiol.*, (1995), 61(2), 793-796.
443. "Screening of IAA from Rhizosphere Microflora of Field Crops", H.L. Vaghasia, R. S. Chudasama, K.R. Bhatt., *Biosci. Discovery*, (2011), 2(1), 94-100.
444. "Selective differentiation of indoleacetic acid and indolebutyric acid using colorimetric recognition after Ehrlich reaction", J.M. Guo, Y.Y. Xin, X.B. Yin, *J. Agric. Food. Chem*, (2010), 58(11), 6556-6561.
445. "Determination of indole-3-acetic acid in soil using excitation-emission matrix fluorescence with trilinear decomposition-based calibration methods", Y.N. Li, H.L. Wu, S.H. Zhu, J.F. Nie, Y.J. Yu, X.M. Wang, R.Q. Yu, *Anal. Sci.*, (2009), 25(1), 83-88.
446. "Use of a graphite-polyurethane composite electrode for electroanalytical determination of indole-3-acetic acid in soil samples", R.A. de Toledo, C.M.P. Vaz, *Microchem. J.*, (2007), 86(2), 161-165.
447. "Amperometric determination of indole-3-acetic acid based on platinum nanowires and carbon nanotubes", R.Z. Wang, L.T. Xiao, M.H. Yang, J.H. Ding, F.L. Qu, G.L. Shen, *Chin. Chem. Lett.*, (2006), 17(12), 1585-1588.
448. "Development of an amperometric indole-3-acetic acid sensor based on carbon nanotubes film coated glassy carbon electrode", K.B. Wu, Y.Y. Sun, S.S. Hu, *Sens. Actuators, B –Chem.*, (2003), 96(3), 658-662.
449. "Adsorptive stripping determination of indole-3-acetic acid at a carbon fiber ultramicroelectrode", L. Hernandez, P. Hernandez, F. Paton, *Anal. Chim. Acta*, (1996), 327(2), 117-123.
450. "Simultaneous determination of three kinds of endogenous hormones content in seeds of post-harvest Yali Pear by high performance liquid chromatography", S.J. Yan, L.W. Guo, C.E. Wu, L.Y. Liang, J.D. Wang, L.N. Zhang, *Chin. J. Anal. Chem.*, (2010), 38(6), 843-847.
451. "Simultaneous determination of several phytohormones in natural coconut juice by hollow fiber-based liquid-liquid-liquid microextraction-high performance liquid chromatography", Y.L. Wu, B. Hu., *J. Chromatogr. A*, (2009), 1216(45), 7657-7663.

452. "Determination of auxin in arabidopsis thaliana by solid phase extraction and high performance liquid chromatography with fluorescence detection", J.H. Fu, J.F. Chu, J.D. Wang, C.Y. Yan, *Chin. J. Anal. Chem.*, (2009), 37(9), 1324-1327.
453. "Determination of plant hormones in fertilizers by high-performance liquid chromatography with photodiode array detection: method development and single-laboratory validation", G.L. Gambino, P. Pagano, M. Scordino, L. Sabatino, E. Scollo, P. Traulo, G. Gagliano, *J.AOAC Int.*, (2008), 91(6), 1245-1256.
454. "Extraction and high performance liquid chromatographic determination of 3-indole butyric acid in pea plants by using imidazolium-based ionic liquids as extractant", G. Absalan, M. Akhond, L. Sheikhan, *Talanta*, (2008), 77(1), 407-411.
455. "Simultaneous determination of phytohormones in plant extracts using SPME and HPLC", H.T. Liu, Y.F. Li, T.G. Luan, C.Y. Lan, W.S. Shu, *Chromatogr.*, (2007), 66(7-8), 515-520.
456. "Determination of free and conjugated indole-3-acetic acid, tryptophan, and tryptophan metabolites in grape must and wine", K. Hoenicke, T.J. Simat, H. Steinhart, H.J. Kohler, A. Schwab, *J. Agric. Food. Chem.*, (2001), 49(11), 5494-5501.
457. "Determination of indole-3-acetic acid in the Gulf of Gdansk by high-performance liquid chromatography of its 4-methyl-7-methoxycoumarin derivative", H. Mazur, A. Kosakowska, K. Pazdro, *J.Chromatogr. A*, (1997), 766(1-2), 261-266.
458. "Determination of indole-3-acetic acid and indole-3-butyric acid in mung bean sprouts using high performance liquid chromatography with immobilized $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ - KMnO_4 chemiluminescence detection", Z.J. Xi, Z.J. Zhang, Y.H. Sun, Z.L. Hi, W. Tian, *Talanta*, (2009), 79(2), 216-221.
459. "A high-throughput method for the quantitative analysis of indole-3-acetic acid and other auxins from plant tissue", L.S. Barkawi, Y.Y. Tam, J.A. Tillman, J. Normanly, J.D. Cohen, *Anal. Biochem.*, (2008), 372(2): p. 177-188.
460. "Simultaneous determination of gibberellic acid, indole-3-acetic acid and abscisic acid in wheat extracts by solid-phase extraction and liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry", S.J. Hou, J. zhu, M.Y. ding, G.H. Lu, *Talanta*, (2008), 76(4), 798-802.

461. "Simultaneous analysis of different classes of phytohormones in coconut (*Cocos nucifera* L.) water using high-performance liquid chromatography and liquid chromatography-tandem mass spectrometry after solid-phase extraction", Z. Ma, L. Ge, A.S.Y. Lee, J.W.H. Yong, S.N. Tan, E.S. Ong, *Anal. Chim. Acta*, (2008), 610(2), 274-281.
462. "Simultaneous determination of 13 phytohormones in oilseed rape tissues by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry and the evaluation of the matrix effect", S. Fan, X. Wang, P. Li, Q. Zhang, W. Zhang, *J. Sep. Sci.*, (2011), 34(6), 640-650.
463. "Direct determination of plant-growth related metabolites by capillary electrophoresis with spectrophotometric UV detection", N.A. Assuncao, S.C. Arruda, A.P. Martinelli, E. Carrilho, *J. Brazilian Chem. Soc.*, (2009), 20(1), 183-187.
464. "Separation of plant hormones from biofertilizer by capillary electrophoresis using a capillary coated dynamically with polycationic polymers", T.F. Jiang, Z.H. Lv, J.Y. Hang, M.E. Yue, *Anal. Sci.*, (2006), 22(6), 811-814.
465. "Determination of indole-3-acetic acid and indole-3-acetylaspartic acid in pea plant with capillary electrophoresis and fluorescence detection", J. Olsson, K. Claeson, B. Karlberg, A.C. Nordstrom, *J. Chromatogr. A*, (1998), 824(2), 231-239.
466. "Determination of indole-3-acetic acid in plant tissues by capillary electrophoresis", M. Bruns, A. Bazzanella, H. Lochmann, K. Bachmann, C. Ullrich Eberius, *J. Chromatogr. A*, (1997), 779(1-2), 342-346.
467. "Determination of plant indoles by capillary electrophoresis with amperometric detection", J.C. Olsson, P.E. Andersson, B. Karlberg, A.C. Nordstrom, *J. Chromatogr. A*, (1996), 755(2), 289-298.
468. "Chemiluminescence determination of indole derivatives in human body fluids and soil by flow injection analysis using potassium permanganate", S. Han, *Microchim. Acta*, (2010), 168(1-2), 169-175.
469. "Luminol enhanced chemiluminescent assay of indole-3-acetic acid", T. Kamidate, H. Andou, *Chem. Lett.*, (1999), (7), 557-558.

