

**Aplicación de la Quimiometría para el aprovechamiento analítico de reactivos generales. Revisión de la incertidumbre instrumental y del Límite de Detección multivariable.**

**Juan Zuriarrain Ocio**

**TESIS DE LA UNIVERSIDAD DEL PAÍS VASCO/EUSKAL HERRIKO UNIBERTSITATEA**

**QUIMICA APLICADA**

**Fecha de Lectura: 16/07/2010**

**CAPITULO 1**

**EL REACTIVO DE FENTON Y SU EMPLEO PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS. QUIMIOMETRÍA APLICADA A PERFILES CINÉTICOS DE REACCIÓN.**

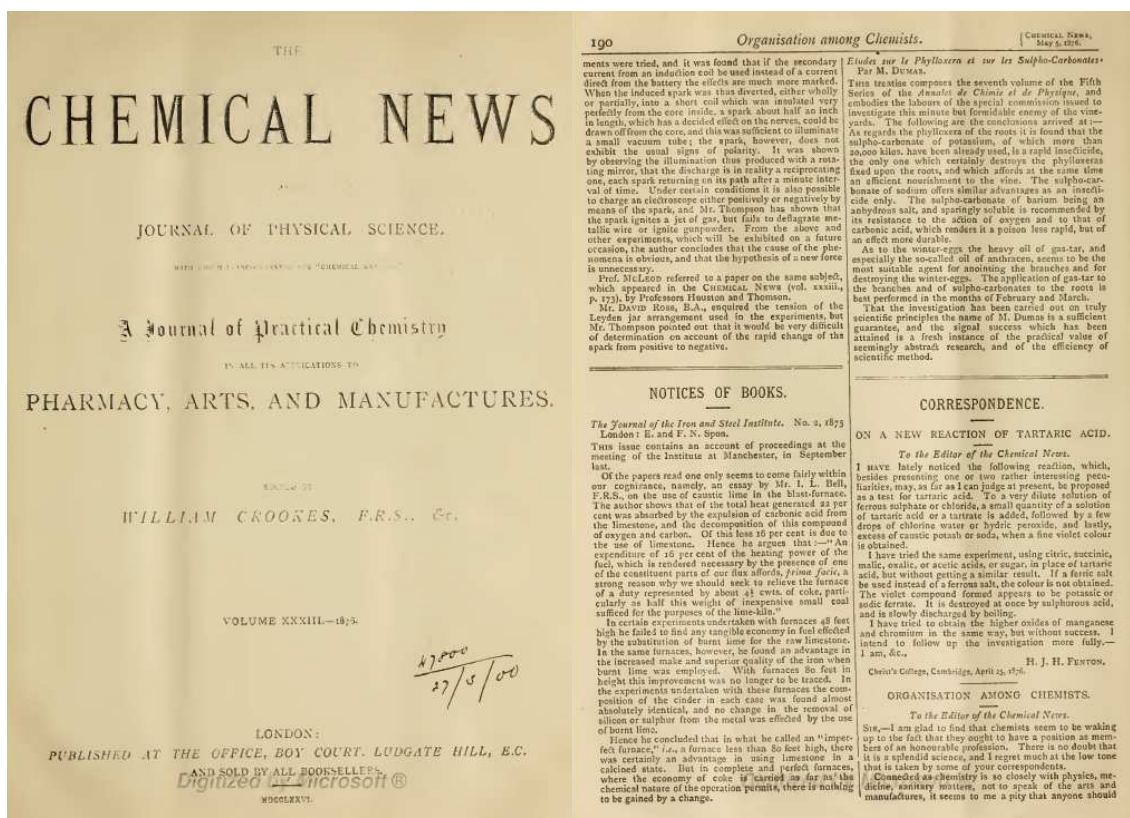


Juan Zuriarrain Ocio, 2010

<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>

<http://addi.ehu.es/handle/10810/5574>

## EL REACTIVO DE FENTON Y SU EMPLEO PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS. QUIMIOMETRÍA APLICADA A PERFILES CINÉTICOS DE REACCIÓN.



The origin of the Fenton reaction appears to be a case of serendipity. A fellow student was mixing reagents at random and obtained a solution with a violet colour that he showed to Fenton. On April 25th, 1876, Fenton, still an undergraduate, sent a brief note to Chemical News, which was published 10 days later, on May 5th.



## 1. INTRODUCCION

El reactivo de Fenton (FR) fue descubierto hace más de 100 años (H. J. H. Fenton), pero su aplicación en procesos oxidativos para la destrucción de sustancias orgánicas tóxicas y contaminantes no se aplicó hasta finales de los 60<sup>1</sup>. Es muy conocido que el proceso de tratamiento de aguas residuales por la reacción de Fenton es muy efectivo en la eliminación de muchos contaminantes orgánicos peligrosos del agua. La principal ventaja es que si las concentraciones de los reactivos (Fe(II) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) no son limitantes, los compuestos orgánicos pueden ser completamente destruidos por conversión total a CO<sub>2</sub> y agua y en el caso de compuestos sustituidos, a sales inorgánicas, siempre que el tratamiento continuase.

El FR cumple diferentes funciones de tratamiento dependiendo de la relación Fe<sup>2+</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Cuando la cantidad de Fe<sup>2+</sup> empleada supera a la de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, el tratamiento tiende a tener un efecto de coagulación o floculación química. Cuando ocurre al revés, el tratamiento tiende a tener el efecto de oxidación química<sup>2</sup>. Numerosos trabajos se han centrado en la búsqueda de las condiciones óptimas para la oxidación/degradación de sustancias orgánicas<sup>3,4</sup>, sin embargo en la presente memoria no se pretende conseguir ninguno de los anteriores efectos, sino el de encontrar unas condiciones en las que el reactivo de Fenton sirva para aplicaciones analíticas.

La atrazina (2-Cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-1,3,5-triazina) es un herbicida muy utilizado para la prevención de plagas en cultivos de maíz<sup>5</sup>, pero que se ha clasificado como un posible carcinógeno<sup>6</sup>; Es por ello que ha cobrado un gran interés el encontrar formas de degradar residuos de atrazina tanto de suelos como de aguas contaminadas. Uno de los medios sugeridos es la utilización del FR ya que oxida la atrazina y otros pesticidas bajo un amplio rango de condiciones, por lo que se han

---

<sup>1</sup> A. Goi and M. Trapido; *Hydrogen peroxide photolysis, Fenton reagent and photo-Fenton for the degradation of nitrophenols: a comparative study*; Chemosphere 46 (2002), 913-922

<sup>2</sup> E. Neyens, J. Baeyens; *A review of classic Fenton's peroxidation as an advanced oxidation technique*; J. Hazard. Mater. 98 (2003), 33-50

<sup>3</sup> Y. Whan Kang and Kyung-Yub Hwang; *Effects of reaction conditions on the oxidation efficiency in the Fenton process*; Wat. Res. 34 (10) 2000, 2786-2790

<sup>4</sup> K. H. Chan and W. Chu; *The dose and ratio effects of Fe(II) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Fenton's process on the removal of atrazine*; Environ. Technol. 24 (2003), 703-710

<sup>5</sup> C.D.S. Tomlin (Ed.); *The Pesticide Manual (A World Compendium) 12th ed.*; British Crop Protection Council, Farnham, Surrey (1991), 55

<sup>6</sup> D. A. Belluc, S.L. Benjamin, T. Dawson, in L. Somasundaram, J.R. Coats (Eds.); *Pesticide Transformation Products: Fate and Significance in the Environment*; American Chemical Society, Washington DC (1991), 254.

llevado a cabo varios estudios sobre la oxidación de estos mediante FR<sup>7,8,9,10</sup>. Sin embargo, como ya se mencionó anteriormente, en esta memoria se pretende el uso del FR para determinaciones analíticas y se ha elegido la atrazina como principal analito para comprobar sus posibilidades, debido a su alto interés medioambiental y a los numerosos estudios que existen sobre este herbicida.

Generalmente la determinación de atrazina se lleva a cabo mediante técnicas cromatográficas<sup>11</sup>, tanto cromatografía de gases<sup>12</sup>, como de líquidos<sup>13,14</sup> aunque también se utilizan otro tipo de técnicas como los inmunoensayos<sup>15</sup> o técnicas electroanalíticas<sup>16</sup>. Cuando la determinación de Atrazina u otros pesticidas tiene interés medioambiental (bien sea suelos, aguas, o atmósfera) se requieren métodos de análisis capaces de detectar muy bajas concentraciones de éstos, y para ello se suelen emplear técnicas de preconcentración previas a la propia etapa de detección<sup>17</sup>. Entre las más utilizadas se encuentran la separación líquido-líquido<sup>18</sup>; la microextracción en fase sólida<sup>19</sup> (SPME)

---

<sup>7</sup> J. Ma, W. Ma, W. Song, C. Chen, Y. Tang, J. Zhao, Y. Huang, Y. Xu, and L. Zang; *Fenton Degradation of organic pollutants in the presence of low-molecular-weight organic acids: cooperative effect of quinone and visible light*; Environ. Sci. Technol. 40 (2006), 618-624

<sup>8</sup> D. A. Saltmiras and A. T. Lemley; *Atrazine degradation by anodic Fenton treatment*; Water Res. 36 (20) 2002, 5113-5119

<sup>9</sup> J. De Laat, H. Gallard, S. Ancelin and B. Legube; *Comparative study of the oxidation of atrazine and acetone by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV, Fe(III)/UV, Fe(III)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV and Fe(II) or Fe(III)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>*; Chemosphere 39 (15) 1999, 2693-2706

<sup>10</sup> K. H. Chan and W. Chu; *Model applications and mechanism study on the degradation of atrazine by Fenton's system*; J. Hazard. Mater. 118 (1-3) 2005, 227-237.

<sup>11</sup> L. J. Krutz, S.A. Senseman, A.S. Sciumbato; *Solid-phase microextraction for herbicide determination in environmental samples*; J. Chromatogr. A., 999 (2003), 103-121.

<sup>12</sup> Wai Tang Ma, Guibin Jiang, Zongwei Cai; *Determination of atrazine and its deethylated degradation product in water and sediment by using gas chromatography/ion trap mass spectrometry*; Int. J. Environ. Anal. Chem. 85 (15) 2005, 1117-1125(9).

<sup>13</sup> H. Prosen, M. Gucek, L. Zupancic-Kralj; *Optimization of liquid chromatography and micellar electrokinetic chromatography for the determination of atrazine and its first degradation products in humic waters without sample preparation*; Chromatographia 60 (2004), S107-S112.

<sup>14</sup> A. Belmonte Vega, A. Garrido Frenich, J.L. Martínez Vidal; *Monitoring of pesticides in agricultural water and soil samples from Andalusia by liquid chromatography coupled to mass spectrometry*; Anal. Chim. Acta 538 (2005), 117-127.

<sup>15</sup> Uzma Maqbool, Anwar-ul- Haq, M. Jamil Qureshi, M. Zafar Iqbal, B. Hock, K. Kramer; *Development of ELISA technique for the analysis of atrazine residues in water*; J. Environ. Sci. Heal. B, 37(4) 2002, 307 - 322.

<sup>16</sup> N. Maleki, G. Absalan, A. Safavi, E. Farjami; *Ultra trace adsorptive stripping voltammetric determination of atrazine in soil and water using mercury film electrode*; Anal. Chim. Acta. 581 (2007), 37-41.

<sup>17</sup> M. C. Bruzzoniti, C. Sarzanini, E. Mentasti; *Preconcentration of contaminants in water analysis*; J. Chromatogr. A. 902 (2000) 289-309.

<sup>18</sup> R. Jeannota, H. Sabikb, E. Sauvarda, E. Geninc; *Application of liquid chromatography with mass spectrometry combined with photodiode array detection and tandem mass spectrometry for monitoring pesticides in surface waters*; J. Chromatogr. A. 879 (2000), 51-71.

<sup>19</sup> A. Bouaid, L. Ramos, M.J. Gonzalez, P. Fernández, C. Cámara; *Solid-phase microextraction method for the determination of atrazine and four organophosphorus pesticides in soil samples by gas chromatography*; J. Chromatogr. A. 939 (2001) 13-21.

y la extracción en fase sólida<sup>20</sup> (SPE) que será la técnica empleada en una de las secciones de esta memoria.

Ya se ha visto una forma de aumentar la sensibilidad de un método analítico, que no es otra que la de incluir una etapa de preconcentración en el mismo. Otro de los problemas que comúnmente se pueden encontrar al realizar análisis de muestras de agua con interés medioambiental es la eliminación e identificación de posibles compuestos presentes en la matriz que interfieran en la determinación del analito de interés<sup>17</sup>. En esta memoria se ha utilizado la Quimiometría como herramienta para eliminar el efecto de estos posibles interferentes, en lugar de eliminarlos físicamente de la matriz en cuestión. De esta forma no es necesario tener información de cualquier otra señal que no sea la del analito de interés, aunque la señal del analito dependa de la presencia de otras sustancias (no linealidad); el efecto puede ser modelado siempre que la interferencia se encuentre presente en las muestras de calibración<sup>21</sup>.

---

<sup>20</sup> M. S. Dopico, M. V. González, J. M. Castro, E. González, J. Pérez, M. Rodríguez, A. Calleja, J. M. L. Vilariño; *Determination of chlorotriazines, methylthiotriazines and one methoxytriazine by SPE-LC-UV in water samples*; Talanta 59 (2003) 561-569.

<sup>21</sup> R. Bro; *Multivariate calibration. What is in chemometrics for the analytical chemist*; Anal. Chim. Acta 500 (2003), 185-194.

## 2. EXPERIMENTAL

### 2.1. Reactivos:

Todos los reactivos utilizados fueron de calidad *para análisis* (Riedel-de-Haën o Fluka) y el metanol de calidad *Pestanal*. Se emplearon sin ningún tipo de purificación previa, y se trabajó utilizando siempre agua bidestilada.

Se preparó una disolución ácida de fuerza iónica  $1 \text{ mol L}^{-1}$ , disolviendo 140,5 g de  $\text{NaClO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  en agua, y añadiendo suficiente ácido sulfúrico para conseguir un pH de 4.40 consiguiendo así un litro de disolución.

Se prepararon disoluciones stock de Atrazina en el rango  $10^{-4}$  –  $1.4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  disolviendo la cantidad necesaria, exactamente pesada, en el volumen adecuado de la disolución ácida anteriormente mencionada y mediante la ayuda de un baño de ultrasonidos. Las disoluciones de otros pesticidas o mezclas de pesticidas utilizados se prepararon de similar forma, y todas ellas se guardaron en refrigerador donde se mantienen estables al menos durante una semana (comprobado espectrofotométricamente).

Las condiciones óptimas de la determinación, para cada caso se obtuvieron mediante diseño experimental. Es por ello que se prepararon disoluciones de distintas concentraciones, y a diferentes valores de pH, pero una vez fijadas las mejores condiciones no se modificaron a lo largo del procedimiento de calibración y aplicación.

Tanto para el caso de muestras disueltas únicamente en agua como para aquellas en presencia de metanol, se utilizaron como reactivos disoluciones de peróxido de hidrógeno  $2.4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  en agua, y de sulfato de hierro (II)  $1.2 \times 10^{-2} \text{ M}$ , en una disolución de ácido sulfúrico de pH 2.75. Sin embargo cuando el sistema de reacción se da en la mezcla agua-acetonitrilo, las concentraciones de las disoluciones de peróxido de hidrógeno y de sulfato de hierro (II) fueron ambas de  $7.2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ .

Para el proceso de preconcentración, se emplearon discos de extracción en fase sólida, de 47 mm de diámetro, Supelco (Envi-Disk 18DSK). Para su correcta utilización se siguieron las recomendaciones que sugería el fabricante.

En el estudio de recuperación de Atrazina en matrices complejas de agua potable, se utilizaron dos muestras del agua “*Chicago 94*” referenciada por el *National*

*Water Research Institute* de Canadá, catálogo del 2004<sup>22</sup>. También se utilizaron dos aguas de grifo procedentes de distintas localizaciones geográficas de Guipuzcoa.

## 2.2. Instrumentacion:

Las medidas espectrofotométricas se realizaron en un espectrofotómetro de diodos en hilera de la marca *Hewlett-Packard*, modelo *HP8452*. Las disoluciones se midieron siempre en cubetas de cuarzo de 10 mm de camino óptico. La temperatura de la cubeta estuvo siempre controlada ( $\pm 0.2$  °C) con el accesorio *HP89090* de control de temperatura. Este accesorio cuenta con un sistema de agitación con el que se mantuvieron las disoluciones constantemente agitadas a 1000 rpm. mediante un pequeño agitador magnético.

Para las medidas volumétricas se trabajó con micropipetas de la marca *Brand* o bien *Eppendorf* y con pipetas y matraces aforados de clase A.

Las medidas cromatográficas se hicieron en un cromatógrafo de gases de la casa *Agilent*, serie *6890*, que incorporaba una columna capilar de dimetilpolisiloxano (no polar), modelo *HP-1*. El detector que incorpora este cromatógrafo es uno de ionización de llama (*FID*).

## 2.3. Ordenadores, programas y tratamiento de datos:

Todos los datos espectrofotométricos se adquirieron con un ordenador *Hewlett-Packard Vectra 386/25N* conectado al espectrofotómetro de diodos; Tras la adquisición los datos se trataron en diferentes ordenadores, en los que estaban instalados diferentes programas.

En el apartado de diseño experimental se utilizó el programa *Statistica* (StatSoft, Tulsa, OK, 1997).

Para los tratamientos de calibración multivariable los datos de absorbancia frente al tiempo obtenidos en el espectrofotómetro, se convirtieron a formato ASCII, mediante un programa casero escrito en QuickBasic. Después se utilizaron con el programa *Unscrambler*, versiones desde la 7.5 a la 9.6 (Camo A/S, Trondheim, 1999-2006), que permite la aplicación de la regresión parcial por mínimos cuadrados (PLS).

---

<sup>22</sup> National Laboratory for Environmental Testing; *Certified Reference Materials & Quality Assurance Services, Catalogue 2004*, v 5.5; National Water Research Institute, Ontario (Canada) 2004.



La señal experimental se hace cero justo antes de añadir el peróxido de hidrógeno (último reactivo) por lo que la respuesta experimental se debe exclusivamente a cambios de la absorbancia durante la reacción. No se necesitó ningún tipo de corrección de la línea base, ni tampoco debido a efectos de deriva. Los datos siempre se centraron antes del tratamiento quimiométrico, y en algunas ocasiones (cuando se mencione) también se autoescalaron<sup>23</sup>.

Las series de calibración y validación se definieron siempre antes de realizar cualquier tratamiento y permanecieron sin cambiarse durante todo el trabajo. Para la construcción del modelo de calibración, se empleó el procedimiento de validación cruzada (dejando cada vez una muestra fuera).

Los resultados se evaluaron utilizando el error relativo calculado según la siguiente ecuación:

$$RE = 100 \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^m (\hat{c}_i - c_i)^2}{\sum_{i=1}^m c_i^2}} \quad (1)$$

donde  $\hat{c}_i$  y  $c_i$  son las concentraciones de analito estimadas y añadidas respectivamente, para la mezcla  $i$ . El error relativo (RE) se puede aplicar tanto a la serie de calibración ( $RE_{cal}$ ) como a la de validación ( $RE_{val}$ ). El número de variables latentes (LVs) se escogió de acuerdo con un método establecido anteriormente<sup>24</sup>. Consiste en que tras haber construido el modelo con la serie de calibración, se aplica a la serie de validación para diferente número de LVs, y se calcula el  $RE_{val}$  en cada caso; se escoge el menor número de LVs para el que el  $RE_{val}$  no difiera significativamente del valor mínimo, según el test F de significancia con una probabilidad  $P=0.25$ .

---

<sup>23</sup> R. Kramer; *Chemometric Techniques for Quantitative Analysis*; Marcel Dekker, New York, 1998, p. 173-179.

<sup>24</sup> D. M. Haaland, E. V. Thomas; *Partial least-squares methods for spectral analyses. I. Relation to other quantitative calibration methods and the extraction of qualitative information*; *Anal. Chem.* 60 (1988), 1193-1202.

## 2.4. Procedimientos:

### 2.4.1. Procedimiento para muestras sintéticas.

Se puso un volumen de  $x$  ml de la disolución de Atrazina, de Bentazona o de Alacloro en una cubeta de 1 cm de paso de luz,  $(2.9 - x)$  ml de la disolución de ácido sulfúrico (fuerza iónica  $1 \text{ mol l}^{-1}$ ) y finalmente se añadieron  $0.050$  ml de la disolución de sulfato de hierro (II). La cubeta se agitó, y posteriormente se mantuvo durante 5 minutos en el portacubetas termostatzado del espectrofotómetro antes de hacer cero la absorbancia ( $A$ ). Tras medir el blanco, se añadieron  $0.050$  ml de la disolución de peróxido de hidrógeno de forma cuidadosa para evitar la mezcla antes de tiempo (que no se produce por la diferente densidad de las disoluciones). Se agitó la cubeta iniciando en el mismo instante (tiempo=0) el seguimiento de la reacción entre 206 y 270 nm cada 4 nm durante 300 s cada 5 s (1037 puntos por cada muestra).

Cuando se utilizó la mezcla agua (40%) - metanol (60%) como medio de reacción, se siguió el mismo procedimiento pero esta vez, poniendo 1.1 ml de la disolución de ácido sulfúrico (fuerza iónica  $\mu=1$ ),  $x$  ml de la disolución de pesticida en metanol puro, y  $(1.8 - x)$  ml de metanol puro; o bien si eran mezclas binarias, 1.1 ml de la disolución de ácido sulfúrico (fuerza iónica  $1 \text{ mol l}^{-1}$ ),  $x$  ml de la disolución de uno de los pesticidas en metanol puro,  $y$  ml de la disolución del otro pesticida en metanol puro, y  $(1.8 - x - y)$  ml de metanol puro. El resto de las disoluciones se utilizaron de igual forma.

Cuando el medio de reacción fue la mezcla agua (75%) - acetonitrilo (25%), también se siguió el citado procedimiento pero esta vez las condiciones óptimas son algo diferentes, por lo que se ponían en la cubeta 2.15 ml de la disolución de ácido sulfúrico (fuerza iónica  $1 \text{ mol l}^{-1}$ ),  $x$  ml de la disolución de Atrazina disuelta en acetonitrilo y  $(0.75 - x)$  ml de acetonitrilo puro. Finalmente se añadieron las mismas cantidades de las disoluciones de Fe (II) y Peróxido de Hidrógeno, a las concentraciones necesarias para conseguir las condiciones óptimas.

### 2.4.2. Procedimiento para muestras de pesticidas comerciales.

Los pesticidas comerciales son generalmente suspensiones acuosas de la sustancia activa o mezclas de ellas, y en algunas ocasiones en presencia de disolventes orgánicos como el xylene. Por ello se cogieron cantidades entre 10 y 40 mg exactamente pesadas de los pesticidas comerciales, su disolvente (agua, xylene etc.) se

dejó evaporar al aire hasta sequedad del producto, cuando fue preciso (estudios de recuperación) se añadió en este momento el pesticida a recuperar, se disolvió en el disolvente que correspondía (agua, metanol o acetonitrilo), y finalmente se llevó a volumen con nuevas fracciones del disolvente. Una vez preparadas estas disoluciones se siguió el procedimiento de muestras sintéticas explicado más arriba.

Para las medidas cromatográficas, una vez evaporado el disolvente, el residuo seco se redissuelve en agua y se filtra con discos de Nylon de 45  $\mu\text{m}$ . En este caso se utilizó el pesticida Linurón como patrón interno. Las mismas muestras se determinaron mediante reacción con el FR y se comprobó que en este caso el resultado es independiente de si se filtran o no.

#### 2.4.3. Procedimiento para muestras de aguas.

Excepto si se menciona lo contrario, se pasa la cantidad de 1 L de agua (de grifo, mineral, bidestilada...etc) conteniendo o no Atrazina añadida, a través de un sistema de extracción en fase sólida tradicional (Imagen 1.a) en el que se colocan los discos de C18 (Envi-Disk 18DSK). Éste se conecta a una trompa de vacío que consta de un manómetro (Imagen 1.b) en el mando del grifo para controlar la presión.



Una vez que se ha pasado todo el volumen de muestra, se lava todo el sistema con alícuotas de agua bidestilada, y se mantiene el vacío hasta que el disco se seque por completo.

Para realizar la elución se van añadiendo alícuotas de metanol sobre el disco de extracción. Nuevas alícuotas de metanol se utilizarán para ir arrastrando y limpiando el sistema. Todo el metanol se recoge en un matraz de 5 ml, a través de un sistema hecho en el laboratorio (Imagen 2.a) que se introduce en el kitasatos de la figura 1.a conectándolo a la salida del embudo (Imagen 2.b).



Una vez recogido todo el metanol de elución y de limpieza en el matraz, éste se lleva a volumen con nuevas fracciones de metanol.

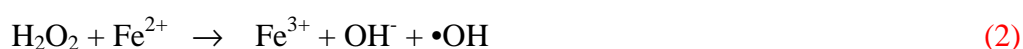
Para la determinación del contenido de atrazina se sigue el procedimiento indicado anteriormente (muestras sintéticas en metanol) pero esta vez poniendo en la cubeta 1.8 ml de esta disolución de elución.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

#### 3.1. El reactivo de Fenton (FR), consideraciones generales:

Se han realizado estudios sobre la lenta oxidación entre los iones  $\text{Fe}^{2+}$  y el peróxido de hidrógeno  $\text{H}_2\text{O}_2$  (reactivo de Fenton) durante más de cien años<sup>25</sup>, sin embargo la cuestión de su mecanismo todavía no se ha resuelto satisfactoriamente. Como ya se indicó anteriormente existe controversia acerca de si la especie intermedia altamente oxidativa es el radical hidroxilo o si por el contrario se trata del ion ferrilo<sup>26</sup>.

Si el radical hidroxilo es el intermedio clave, la etapa de iniciación sería:



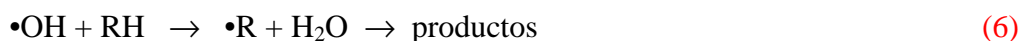
Después, los radicales  $\bullet\text{OH}$  pueden oxidar otro  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$  (etapa de terminación):



o bien pueden reaccionar con  $\text{H}_2\text{O}_2$  (etapa de propagación).



También, el radical  $\bullet\text{OH}$  puede oxidar otras especies (sustratos) presentes en la disolución:



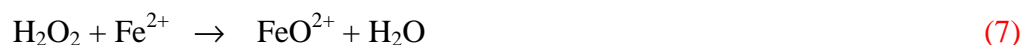
La secuencia de reacciones (2)-(3) corresponde a la oxidación estequiométrica de  $\text{Fe}^{2+}$  por el  $\text{H}_2\text{O}_2$  (reacción primaria). La secuencia de reacciones (2), (4), (5),

<sup>25</sup> W. H. Koppenol; *Facts and Fiction in Free Radical Biochemistry: The Haber-Weiss Cycle*; Oxygen Society Annual Meeting, San Diego, CA Nov 17 -20, 2000.

<sup>26</sup> H. B. Dunford; *Oxidations of iron(II)/(III) by hydrogen peroxide: from aquo to enzyme*; Coord. Chem. Rev., 233-234 (2002), 311.

corresponden a la desproporción del  $\text{H}_2\text{O}_2$  catalizada por  $\text{Fe}^{2+}$ . Las reacciones (3) y (6) están en competencia, así que, concentraciones relativas altas de  $\text{Fe}^{2+}$  favorecerán la reacción primaria y por lo tanto no se oxidarán sustratos orgánicos, mientras que concentraciones relativas bajas de  $\text{Fe}^{2+}$  conducirán a reacciones en cadena inducida en las que los sustratos orgánicos se oxidarán. Las reacciones (2)-(5) corresponden al Reactivo de Fenton. La reacción (6) es una etapa de propagación y el origen de una reacción en cadena inducida en la que el sustrato finalmente es oxidado (la reacción de Fenton).

Si por otra parte, la especie intermedia clave es el ion ferrilo, el primer paso sería:



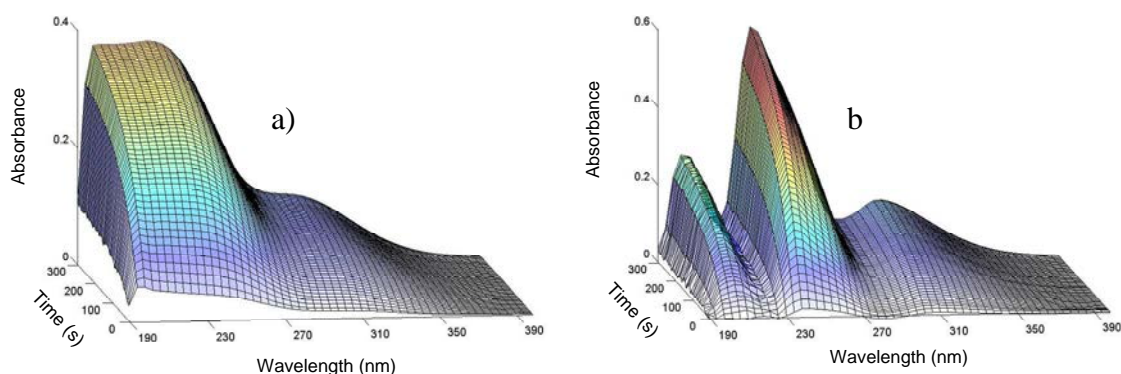
Después, la especie  $\text{FeO}^{2+}$  puede dar reacciones similares a (3), (4) y (6); esto es:



Se pueden hacer las mismas consideraciones que en caso del radical hidroxilo, y se predicen cinéticas y estequiometrías similares<sup>27</sup>.

Experimentalmente se ha comprobado que puede seguirse espectrofotométricamente la evolución del FR (Figura 1.a), así como la de la reacción de Fenton (Figura 1.b).

<sup>27</sup> C. Walling, *Intermediates in the Reactions of Fenton Type Reagents*; Acc. Chem. Res., 31 (1998), 155.



**Fig.1:** Evolución de la señal espectrofotométrica de la mezcla de reacción  $\text{H}_2\text{O}_2 - \text{Fe}^{2+}$  a lo largo del tiempo, en a) en ausencia y en b) en presencia de Atrazina  $9.1 \times 10^{-5}$  M.  $[\text{H}_2\text{O}_2] = 3.9 \times 10^{-5}$  M;  $\text{Fe}^{2+} = 2 \times 10^{-4}$  M; En medio de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $10^{-2}$  M y  $\text{NaClO}_4$  1 M;  $T^a = 25$  °C.

La diferencia que se observa en la evolución del espectro entre ambos casos, se debe principalmente a la diferente extensión de la reacción entre el  $\text{Fe}^{2+}$  y el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , a la desaparición de la Atrazina y a la aparición de productos de oxidación en la disolución (Figura 1.b). Todo esto representa la información tanto cinética como espectral. Dado que la extensión de la reacción inducida (reacción (6)) depende de la concentración de Atrazina, se podrá relacionar la información experimental, con la concentración inicial de Atrazina. Basándonos en estas observaciones, se puede proponer un método analítico.

Tal y como ya se mencionó, la finalidad de esta propuesta es la de crear un método analítico, y por ello no son válidas las condiciones óptimas encontradas para otros propósitos como lo son por ejemplo la oxidación sustancias orgánicas<sup>3</sup>, la decolorización de tintes<sup>28,29</sup> o su utilización como técnica de pretratamiento<sup>30</sup>.

Con este propósito se optimizan las condiciones para conseguir la máxima extensión de la reacción inducida (oxidación de Atrazina) con la mínima extensión de la reacción primaria (oxidación de  $\text{Fe}^{2+}$ ); En otras palabras, la relación “señal/ruido” deberá ser lo más alta posible, considerando como señal la obtenida cuando se oxida Atrazina (Figura 1.b) y como ruido, la señal obtenida en ausencia de Atrazina (Figura 1.a).

<sup>28</sup> S. Acarbabacan, I. Vergili, Y. Kaya, G. Demir and H. Barlas; *Removal of color from textile wastewater containing azo dyes by Fenton's reagent*; Fresen. Environ. Bull. 11(10b) 2002, 840-843.

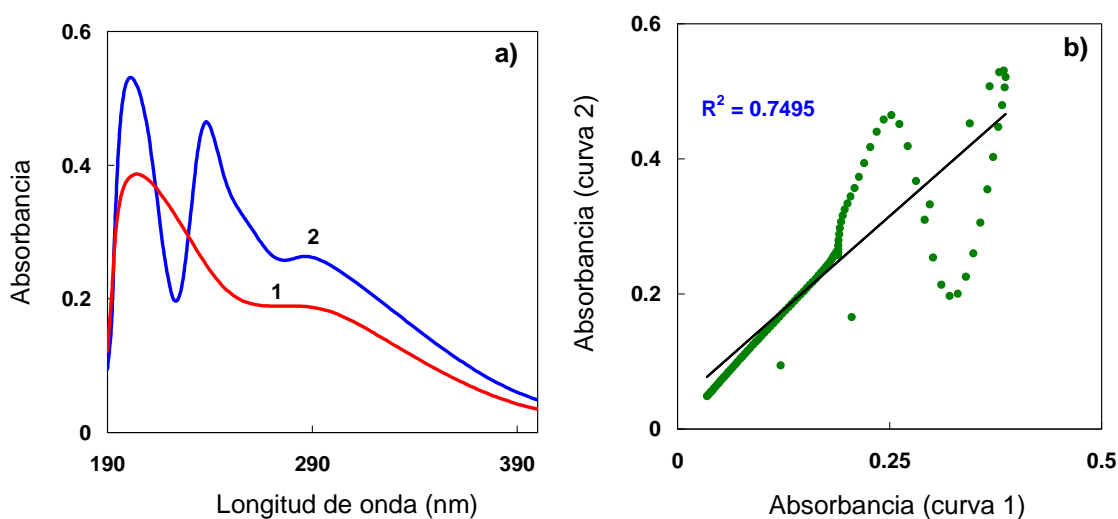
<sup>29</sup> J. Herney Ramirez, Carlos A. Costa and Luis M. Madeira; *Experimental design to optimize the degradation of the synthetic dye Orange II using Fenton's reagent*; Catal. Today 107-108 (2005) 68-76.

<sup>30</sup> Francisco J. Rivas, Fernando J. Beltrán, Olga Gimeno and Pedro Alvarez; *Optimisation of Fenton's reagent usage as a pre-treatment for fermentation brines*; J. Hazard. Mater. B96 (2003) 277-290.

### 3.2. Optimización:

El reactivo de Fenton proporciona una muy amplia señal de fondo (Figura 1.a) por lo que es muy complicado escoger la señal a una única longitud de onda como parámetro para la optimización. Es por ello que el parámetro empleado para la optimización será el coeficiente de correlación lineal espectral<sup>31</sup> “ $\rho^{espectral}$ ”, mejor dicho, la diferencia “ $1 - \rho^{espectral}$ ”. Parámetros similares ya se habían utilizado en análisis cinético con el fin de evaluar la posibilidad de discriminación en sistemas químicos<sup>32</sup>.

En este caso se representará para cada longitud de onda entre 206 y 270 nm (es la zona donde se encuentran mayores diferencias) del espectro obtenido a los 304 s de reacción, el valor de la absorbancia cuando el FR reacciona en presencia de Atrazina ( $4.64 \times 10^{-5}$  M), frente al valor de la absorbancia obtenido cuando el FR evoluciona en ausencia de Atrazina (Figura 2.a). Se trazará una recta de regresión lineal para los puntos obtenidos, y se toman como  $\rho^{espectral}$  el valor de  $r^2$  de esa recta (Figura 2.b).



**Fig.2:** a) Espectros a los 304 s de reacción de 1) FR ( $[H_2O_2] = 4 \times 10^{-5}$  M;  $[Fe^{2+}] = 2 \times 10^{-4}$  M; pH= 4 ( $H_2SO_4$ ),  $\mu = 1$  ( $[NaClO_4] = 1$  M)); 2) FR (mismas condiciones) + Atrazina  $4,64 \times 10^{-5}$  M.  
b) Obtención de  $\rho^{espectral} = r^2$ . El parámetro de optimización será:  $1 - \rho^{espectral}$ .

Valores altos de  $(1 - \rho^{espectral})$  significará que existe una gran diferencia entre el espectro cuando hay presencia de Atrazina y cuando no la hay, y por lo tanto se podrán

<sup>31</sup> S. R. Crouch, J. Coello, S. Maspocho, M. Porcel; *Evaluation of classical and three-way multivariate calibration procedures in kinetic-spectrophotometric analysis*; Anal. Chim. Acta 424 (2000) 115-126.

<sup>32</sup> Liang Xu and Israel Schechter; *Optimization Method for Simultaneous Kinetic Analysis*; Anal. Chem. 68 (1996), 1842-1850.



esperar unas buenas condiciones para realizar un calibrado. Si  $(1 - \rho^{spectral})$ , tiene un valor bajo, las diferencias serán escasas y no se esperarán unas buenas condiciones.

De acuerdo con la literatura<sup>3,33,34</sup>, las variables que más influyen en la reacción de Fenton, son las concentraciones de  $H_2O_2$  y  $Fe^{2+}$ , la acidez y la relación de concentraciones  $[H_2O_2] / [Fe^{2+}]$ . El objetivo de estos estudios es principalmente la degradación de Atrazina u otros contaminantes, por lo que la formación de precipitados, por ejemplo, no tiene ninguna importancia, aunque es un factor muy relevante en el caso de un método analítico.

Con el fin de encontrar las condiciones que más favorezcan nuestro objetivo, se realizaron unas pruebas previas para encontrar el medio adecuado de reacción. Al hacer reaccionar el  $H_2O_2$  con el  $Fe^{2+}$  en tampón de fosfato (pH=7), se encontró que aparecen precipitados, aunque el pH disminuya (puede que se dé la formación de complejos fosfatados no solubles de los productos de oxidación del  $Fe^{2+}$ ). Cuando se utiliza un tampón de Acido acético/ Acetato, no se encuentran diferencias entre la reacción en presencia o en ausencia de Atrazina por lo que este medio de reacción no es apropiado para un método analítico. Sin embargo, se encuentran diferencias apreciables, cuando el medio de reacción es  $H_2SO_4$   $10^{-2}$  M (Figura 1), y tanto mayores son las diferencias cuanto mayor es el pH. Debido a esto, se realizó un estudio de las variables químicas con el fin de encontrar las condiciones óptimas para el método y para ello se aplicó la metodología del diseño experimental<sup>35</sup>.

Primeramente se escogió un diseño factorial completo a dos niveles<sup>36</sup> con el propósito de determinar cuál de las variables estudiadas ( $[H_2O_2]$ ,  $[Fe^{2+}]$ , acidez y temperatura) tiene mayor relevancia en la obtención del anteriormente citado parámetro de respuesta  $(1 - \rho^{spectral})$ . A la hora de escoger los niveles para cada variable, se impusieron algunas restricciones de acuerdo con los resultados obtenidos en algunas pruebas previas realizadas. Por ejemplo, cuando la reacción se produce en medio de  $H_2SO_4$ , a un pH superior a 4, pueden formarse precipitados de  $Fe^{2+}$  (y/o  $Fe^{3+}$ ), mientras

---

<sup>33</sup> K. H. Chan, W. Chu; *Modeling the reaction kinetics of Fenton's process on the removal of atrazine*; Chemosphere 51 (2003) 305–311.

<sup>34</sup> S. Chiron, A. Fernandez-Alba, A. Rodriguez, J.A. Peres; *Pesticide chemical oxidation: state-of-the-art*; Water Res.; 34 (2000) 366-377.

<sup>35</sup> K. H. Esbensen, *Multivariate data analysis – In practice. 5º Ed.*, CAMO Software AS, Oslo (2006), 361.

<sup>36</sup> A. Gustavo González; *Two level factorial experimental designs based on multiple linear regression models: a tutorial digest illustrated by case studies*; Anal. Chim. Acta 360 (1998); 227-241.

que si la reacción se produce a pH inferior a 1, no se produce apenas la reacción inducida de forma apreciable.

Los niveles estudiados para cada una de las variables, así como el parámetro de respuesta ( $1 - \rho^{espectral}$ , obtenido para el rango 206-270 nm) para cada uno de los experimentos, se pueden encontrar en la siguiente tabla (**Tabla 1**). Se incluyeron en el estudio, tres replicados del punto central, para asegurarnos de que la variabilidad obtenida es debida al efecto de las variables y no al del posible error experimental.

**Tabla 1.**

Valores de las variables experimentales en el diseño factorial completo, y valor de la respuesta obtenida ( $1 - \rho^{espectral}$ )<sup>a</sup> para cada caso. Los experimentos se realizaron en orden aleatorio.

Exp.	pH	T (°C)	10 <sup>5</sup> x mol l <sup>-1</sup>		1- $\rho^{espectral}$
			Fe <sup>2+</sup>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	
1	4.0	25.0	4.00	20.0	0.9921
2	4.0	40.0	4.00	4.00	0.6048
3	4.0	40.0	20.0	20.0	0.7825
4	1.0	40.0	20.0	4.00	0.2120
5	1.0	25.0	4.00	4.00	0.1909
6	1.0	40.0	4.00	20.0	0.2186
7	4.0	25.0	20.0	4.00	0.9751
8	1.0	40.0	20.0	20.0	0.1843
9	4.0	25.0	4.00	4.00	0.9836
10	1.0	25.0	20.0	20.0	0.2538
11	1.0	25.0	4.00	20.0	0.1269
12	4.0	40.0	4.00	20.0	0.9283
13	4.0	25.0	20.0	20.0	0.9962
14	1.0	40.0	4.00	4.00	0.2521
15	4.0	40.0	20.0	4.00	0.7594
16	1.0	25.0	20.0	4.00	0.3090
17	2.5	32.5	12.0	12.0	0.6023
18	2.5	32.5	12.0	12.0	0.6165
19	2.5	32.5	12.0	12.0	0.5766

<sup>a</sup> Coeficiente de correlación espectral (ver texto)

Los resultados obtenidos tras aplicar análisis de la varianza (ANOVA) pueden resumirse en la siguiente gráfica (**Figura 3**), a modo de *Pareto*, junto a una línea (probabilidad P=0.05) que señala cuáles de las variables estudiadas puede producir un efecto más significativo en la obtención del parámetro de respuesta.

En este gráfico, la longitud de las barras es proporcional al valor absoluto de los efectos estimados. La línea vertical corresponde al intervalo de confianza del 95%. Cualquier efecto que sobrepase esta línea, puede considerarse significativo en lo que a la respuesta se refiere. El signo positivo indica que la respuesta será mayor conforme aumente el valor de la variable correspondiente, mientras que el signo negativo significa que la respuesta aumentará si se toma el valor más bajo de la variable.

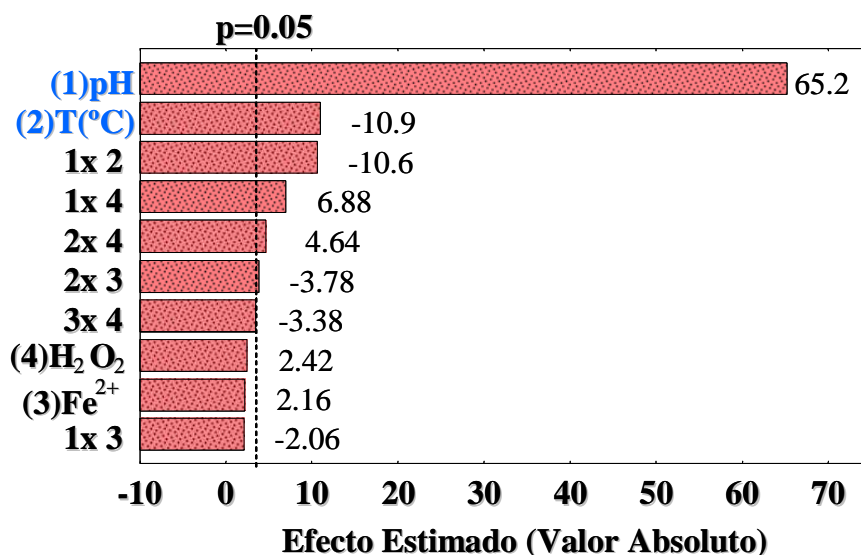


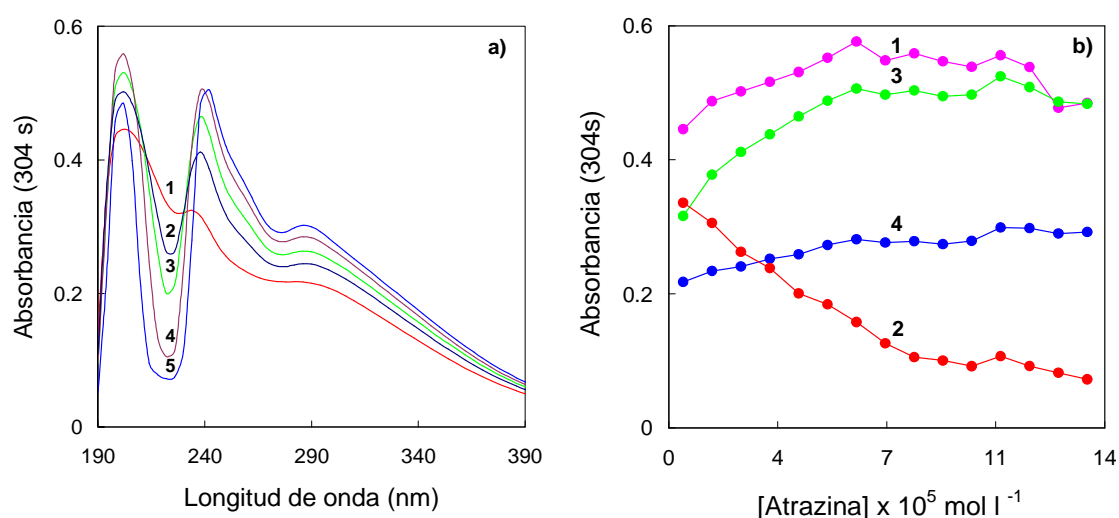
Fig.3: Gráfica *pareto* de los efectos obtenida a partir del análisis de la varianza de los datos del diseño factorial completo. La línea punteada marca las variables principales o combinadas que tienen un efecto significativo (al 95 % de probabilidad) sobre la obtención de la respuesta  $1 - \rho^{espectral}$ .

Como se observa, el pH es la variable que significativamente más influye en la obtención de una respuesta alta, por lo tanto se tomó un valor de pH=4. Aparte de algún efecto combinado, la otra variable principal que significativamente influye en la respuesta obtenida es la temperatura, y el signo negativo indica que un valor bajo de esta variable, influirá positivamente en la obtención de una respuesta más alta. Se trabajará a una temperatura de 25 °C, cercana a la temperatura ambiente, ya que es más fácil de controlar.

El valor de las otras dos variables es fruto de un compromiso, ya que por lo visto no parecen ser significativas. A pH = 4, concentraciones bajas de Fe<sup>2+</sup> proporcionan valores muy bajos de absorbancia y concentraciones superiores a  $2 \times 10^{-4}$  M pueden provocar la aparición de precipitados. Se cogió un valor de  $[Fe^{2+}] = 2 \times 10^{-4}$  M. Por otro lado, y también a pH = 4, cuanto mayor es la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> más rápida es la reacción y mucho más difícil de seguirla adecuadamente, por lo que se tomó un valor de  $[H_2O_2] = 4 \times 10^{-5}$  M.

### 3.3. Calibración:

Una vez obtenida la información cinético espectral de la reacción de Fenton con diferentes concentraciones de Atrazina, se podría pensar en realizar un calibrado siguiendo métodos clásicos, bien de equilibrio o cinéticos. Por ejemplo puede tomarse el valor de la absorbancia a una longitud de onda cuando la reacción casi se ha completado (Figura 4.a) y relacionarlo con la concentración de Atrazina inicial. Esta representación puede verse en la siguiente figura (Figura 4.b).



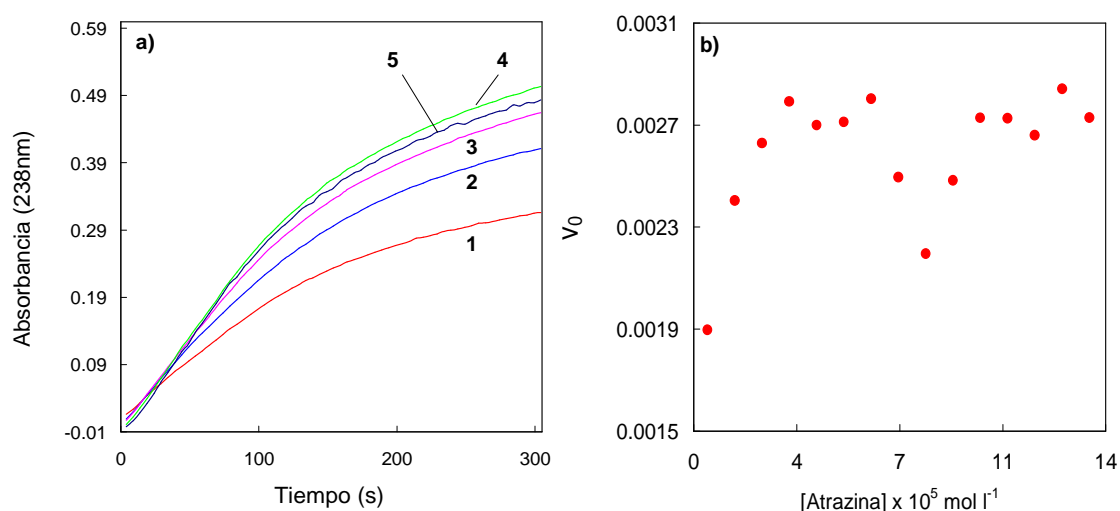
**Fig.4:** a) Espectros a los 304 s de la reacción entre el FR ( $[H_2O_2] = 4 \times 10^{-5} \text{ M}$ ;  $[Fe^{2+}] = 2 \times 10^{-4} \text{ M}$ ;  $\text{pH} = 4$  ( $H_2SO_4$ ,  $[NaClO_4] = 1 \text{ M}$ ) y  $T^a = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ) y Atrazina 1) 0.46; 2) 2.3; 3) 4.2; 4) 7.9 y 5)  $13.4 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ . b) Absorbancia a los 304 s de reacción entre el FR y distintas concentraciones de Atrazina, para diferentes longitudes de onda: 1) 202 nm; 2) 222 nm; 3) 238 nm y 4) 274 nm.

No se encuentra a lo largo de todo el espectro una longitud de onda adecuada para hacer este tipo de calibrado, y que el rango de concentraciones de Atrazina sea suficiente amplio, por lo que habrá que buscar otros métodos.

Otra posibilidad sería tener en cuenta los perfiles cinéticos de reacción para diferentes concentraciones de Atrazina, y plantear un calibrado por alguno de los métodos cinéticos conocidos. En nuestro caso se ha intentado la representación de la velocidad inicial de los perfiles de reacción frente a la concentración inicial de Atrazina<sup>37</sup>. En la siguiente figura se representan los perfiles cinéticos a una de las longitudes de onda (la de mayor variación), para algunas de las concentraciones de Atrazina (Figura 5.a). Y a su lado la representación de las velocidades iniciales frente a

<sup>37</sup> D. Pérez-Bendito and M. Silva; *Kinetic methods in analytical chemistry*, Ellis Horwood, Chichester, (1988), p. 25.

la concentración inicial de Atrazina puesta (Figura 5.b). Esta representación se ha probado para diferentes longitudes de onda, no habiendo encontrado una a la que se encuentre una relación lineal para un rango suficientemente amplio de concentraciones de Atrazina.



**Fig.5:** a) Perfiles cinéticos seguidos a 238 nm de la reacción entre el FR ( $[\text{H}_2\text{O}_2] = 4 \times 10^{-5} \text{ M}$ ;  $[\text{Fe}^{2+}] = 2 \times 10^{-4} \text{ M}$ ;  $\text{pH} = 4$  ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $[\text{NaClO}_4] = 1 \text{ M}$ ) y  $T^a = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ) y diferentes concentraciones de Atrazina; 1)  $0.46$ ; 2)  $2.3$ ; 3)  $4.2$ ; 4)  $7.9$  y 5)  $13.4 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ . b) Representación de las velocidades iniciales (tomadas entre 4 y 24 s; 5 puntos) de la reacción de Fenton con Atrazina frente a concentración inicial de Atrazina.

Una alternativa a estos métodos clásicos de calibración, es el uso de los métodos de calibración multivariable. Estos permiten utilizar toda la información cinética y espectral adquirida, completamente al margen del mecanismo de reacción<sup>38</sup>, es decir sin necesidad de conocer la velocidad de reacción, constantes de velocidad, absortividades, etc. Entre los diferentes algoritmos que pueden utilizarse, la Regresión Parcial por Mínimos Cuadrados (PLSR), es la técnica que se ha convertido en más popular. PLS es un método de calibración de primer orden, capaz de manejar un vector de datos (variables independientes) por cada muestra (datos bidimensionales tales como espectros o perfiles cinéticos). Los métodos de calibración de segundo orden, tales como el PARAFAC (Paralell Factor Analysis) hacen uso de una matriz de datos por cada muestra (datos tridimensionales como una sucesión de espectros a lo largo del tiempo). Los datos que se han obtenido mediante un espectrofotómetro de diodos pertenecen a este último caso, sin embargo, pueden reorganizarse para convertirse en un

<sup>38</sup> Cullen, T.F.; Crouch, S.R.; *Multicomponent kinetic determinations using multivariate calibration techniques*; *Microchim. Acta*, 126 (1997), 1-9.

vector de datos por muestra, uniendo sucesivamente los espectros obtenidos a cada tiempo uno detrás de otro.

Cuando se han hecho comparaciones entre ambos tipos de métodos de calibración multivariable aplicados a datos cinéticos espectrofotométricos, PLS siempre obtuvo resultados similares o incluso mejores que aquellos métodos de calibración de segundo orden<sup>31</sup>, en cuanto a capacidad predictiva se refiere.

En nuestro caso se ha empleado PLS como algoritmo de calibración para las muestras sintéticas de la siguiente tabla (**Tabla 2**), en la que se dan los errores encontrados junto con las características del modelo. El número adecuado de LVs para este modelo es dos, siguiendo el procedimiento que ya se explicó en la la sección **2.3** del presente capítulo.

**Tabla 2.**

Errores encontrados en la determinación de Atrazina, cuando se determinó con FR, tras aplicar PLS como método de calibración<sup>a</sup>.

Muestra	[Atrazina] x 10 <sup>5</sup> mol l <sup>-1</sup>		Error (%)
	Puesto	Hallado	
1 <sup>b</sup>	0.46	0.39	-15
2 <sup>c</sup>	1.40	1.60	14
3 <sup>b</sup>	2.3	2.4	4.3
4 <sup>c</sup>	3.2	3.3	3.1
5 <sup>b</sup>	4.2	4.3	2.4
6 <sup>c</sup>	5.1	5.2	2.0
7 <sup>b</sup>	6.0	5.9	-1.7
8 <sup>c</sup>	7.0	6.9	-1.4
9 <sup>b</sup>	7.9	7.9	-
10 <sup>c</sup>	8.8	8.8	-
11 <sup>b</sup>	9.7	9.9	2.1
12 <sup>c</sup>	10.7	10.8	0.9
13 <sup>b</sup>	11.6	11.5	-0.9
14 <sup>c</sup>	12.5	12.9	3.2
15 <sup>b</sup>	13.4	13.4	-
		<i>RE<sub>cal</sub></i>	1.3%
		<i>RE<sub>val</sub></i>	2.3%

<sup>a</sup> Datos autoescalados. Modelo PLS definido con 2 variables latentes (LVs).

<sup>b</sup> Grupo de calibración.

<sup>c</sup> Grupo de validación.

La primera variable latente (*LV*) explica un 76 % de la varianza en el bloque *X*, mientras que la segunda explica el 19 %. En el bloque *Y* la primera *LV* explica el 96 % de la varianza y la segunda el 4 %. Por otro lado, el coeficiente de correlación entre el bloque *X* e *Y* es 0.981 en la primera *LV* mientras que es de 0.991 para la segunda, demostrando que seguramente se incluya algo de no linealidad en la primera *LV*.

Se realizó también un estudio de la precisión y exactitud del método, midiendo repetidas veces dos niveles de concentración de Atrazina preparados cada vez con disoluciones stock diferentes. Los resultados de este estudio se presentan a continuación en la siguiente tabla (**Tabla 3**).

**Tabla 3.**

Resultados de la precisión y exactitud del modelo descrito en la **Tabla 2** al aplicarlo a repetidas muestras de Atrazina. Se da también el intervalo de confianza <sup>a</sup>.

[Atrazina] x 10 <sup>5</sup> mol l <sup>-1</sup>				
Puesto	Media Hallada	$\sigma$	Intervalo de Confianza	Error (%)
4.6	4.7 <sup>b</sup>	0.3	4.1 – 5.3	2.2
8.8	9.1 <sup>c</sup>	0.3	8.5 – 9.7	3.4

<sup>a</sup> Valor medio  $\pm 2 \sigma$ .

<sup>b</sup> Valor medio de 10 repeticiones realizadas en 7 sesiones a lo largo de 35 días.

<sup>c</sup> Valor medio de 7 repeticiones realizadas en 4 sesiones a lo largo de 10 días.

Cuando se comparan los resultados obtenidos con otros métodos de equilibrio o cinéticos de calibración, PLS proporciona mayor precisión y puede ser aplicado a un rango de concentraciones mucho más amplio. El rango dinámico está limitado por el propio sistema químico: para concentraciones bajas de Atrazina, la señal no difiere significativamente de la del FR (fondo), mientras que concentraciones mayores que  $13.5 \times 10^{-5}$  M, la Atrazina no es soluble en las condiciones a las que se trabaja<sup>39</sup>. El límite de detección estadístico se define para situaciones en las que se aplica una recta de regresión, lo que no es el caso; Sin embargo el límite de detección práctico debería estar muy próximo a la mínima concentración medida en la **Tabla 2** ( $0.46 \times 10^{-5}$  M).

<sup>39</sup> C. D. S. Tomlin (Ed.), *The Pesticide Manual (A World Compendium)*, 12 ed., British Crop Protection Council, Farnham, Surrey, 1991, p.42.

Otros métodos de calibración espectroscópicos o cromatográficos suelen tener límites de detección similares o algo inferiores, pero generalmente incluyen una etapa de extracción previa o preconcentración<sup>40</sup>. Por otro lado, los métodos basados en anticuerpos y enzimas tienen límites de detección mucho menores, pero encuentran otros problemas tales como tiempos de análisis muy largos poca reproducibilidad, reactividad cruzada, etc.<sup>41,42</sup>.

---

<sup>40</sup> A. Fajgelj, Á. Ambrus (Eds.), *Principles and Practices of Method Validation*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2000, p. 13.

<sup>41</sup> M. A. González-Martínez, R. Puchades, A. Maquieira, I. Ferrer, M.P. Marco and D. Barceló; *Reversible immunosensor for the automatic determination of atrazine. Selection and performance of three polyclonal antisera*; *Anal. Chim. Acta* 386 (1999), 201 – 210.

<sup>42</sup> J. Gascón, A. Oubiña, I. Ferrer, P. Önerfjord, G. Marko-Varga, B.D. Hammock, M.P. Marco and D. Barceló; *Performance of two immunoassays for the determination of atrazine in sea water samples as compared with on-line solid phase extraction-liquid chromatography-diode array detection*; *Anal. Chim. Acta* 330 (1996), 41 – 51.



### 3.4. Aplicación:

Se probaron algunas muestras de pesticidas comerciales basadas en Atrazina. Estos pesticidas se presentan generalmente como suspensiones concentradas acuosas de la sustancia activa. Tras diluir apropiadamente la muestra, se llevó a cabo la determinación de atrazina sin ningún otro tipo de tratamiento posterior. Los resultados obtenidos se encuentran en la **Tabla 4**, junto con un estudio de recuperación para muestras con Atrazina añadida (Ver procedimiento para muestras comerciales). Como referencia se determinó la atrazina presente por cromatografía de gases en las mismas muestras (Ver Anexo I-1), y los resultados también se presentan.

**Tabla 4.**

Determinación de atrazina en muestras comerciales y estudio de recuperación usando el reactivo de Fenton. La desviación estándar está entre paréntesis (s). Cada resultado es la media de tres determinaciones (a menos que se indique otra cosa). Los resultados obtenidos por cromatografía de gases se dan como referencia.

Muestra	% Atrazina en muestra (p/p)			[Atrazina] x 10 <sup>5</sup> (mol l <sup>-1</sup> )		Recuperado (%)
	Reportado	GC	FR	Añadido	Hallado	
Agrecina A LA <sup>a)</sup>	43.0	42 (2)	54 (1) <sup>b)</sup>	2.32	2.52 (0.08)	109 (4)
				4.64	4.54 (0.07)	98 (2)
				6.95	7.0 (0.1)	101 (2)
Atrakey <sup>c)</sup>	43.5	43 (2)	40.5 (0.8)	2.32	3.02 (0.02)	130 (3)
				4.64	4.95 (0.10)	107 (3)
				6.95	7.1 (0.2)	102 (3)
Azinex FLO <sup>d)</sup>	42.8	38 (3)	36 (1) <sup>b)</sup>	1.05	0.98 (0.04)	93 (5)
				1.30	1.20 (0.07)	92 (6)
Atrazerba FL <sup>e)</sup>	45.0	41 (2)	47 (3)	2.32	2.19 (0.06)	94.4 (6)
				4.64	4.8 (0.2)	104 (7)
				6.95	7.3 (0.2)	104 (6)

<sup>a)</sup> Calliope S.A.S. (Nogueres, Francia).

<sup>b)</sup> Seis replicados durante dos sesiones diferentes.

<sup>c)</sup> Industrial Química Key, S.A. (Tarragona, España).

<sup>d)</sup> Aragonesas Agro, S.A. (Humanes de Madrid, España).

<sup>e)</sup> Sapec Agro, S.A. (Reus, España).

Los valores obtenidos con el FR se pueden considerar satisfactorios. También se obtuvieron resultados satisfactorios en los estudios de recuperación excepto en un caso para la muestra “Atrakey” en la que la cantidad recuperada de atrazina fue del 130%.

Una vez disueltas, las muestras comerciales de pesticidas presentaban espectros de UV que parecían similares al de la Atrazina pura. Por ello, y a modo de comparación, se probaron otros modelos de calibración más simples para las mismas muestras de la Tabla 4, pero sin el uso del FR. Los calibrados se realizaron con disoluciones de Atrazina pura bajo las mismas condiciones de acidez y fuerza iónica dadas en la sección “experimental”. En un caso, las rectas de calibración se hicieron tanto a 222 nm como a 264 nm, donde la atrazina presenta máximos de absorción (Ver Anexo I-2) que cumplen la ley de Beer.

En otro caso, el modelo de calibración se obtuvo aplicando PLS al espectro completo de la muestra entre 190 y 290 nm. Los resultados obtenidos en los tres casos se encuentran en la **Tabla 5**. Los contenidos de atrazina encontrados estaban siempre entre un 11 y un 38 % en exceso sobre el valor reportado, difiriendo significativamente de los resultados obtenidos por cromatografía. Cuando se comparan los resultados de las **Tablas 4 y 5**, uno puede entender la utilidad del FR para la determinación de atrazina en las muestras consideradas.

**Tabla 5.**

Determinación de Atrazina en muestras comerciales utilizando únicamente datos espectrales (sin reactivo Fenton).

Muestra	% Atrazina en muestra (p/p)			
	Reportado	222 nm	264 nm	PLS <sup>a</sup>
Agrecina A LA	43.0	55.8	59.0	59.5
Atrakey	43.5	48.2	58.7	53.3
Azinex FLO	42.8	52.5	52.8	53.3
Atrazerba FL	45.0	57.1	57.3	55.5

<sup>a</sup> Modelo PLS definido con 2 Variables Latentes (LVs)

### 3.4.1. Efecto de otras especies y modelado de interferencias:

Cuando se usa el FR como reactivo, la principal desventaja que se puede esperar es una baja selectividad. Aquellas especies que presenten una absorción constante (interferencias espectrales), así como especies que den reacción con la especie intermedia reactiva, incluyendo supresores de la reacción inducida (secuestradores e inhibidores) pueden considerarse como posibles interferentes<sup>43</sup>.

**Tabla 6.**

Interferencias en la determinación de atrazina  $4.64 \times 10^{-5}$  M con el reactivo de Fenton.

Interferencia	Tolerado <sup>a</sup>	No tolerado <sup>b</sup>
Simazina	$0.50 \times 10^{-5}$ mol l <sup>-1</sup>	$0.94 \times 10^{-5}$ mol l <sup>-1</sup>
Alacloro	0.37	1.8
Carbarilo	0.05	0.25
Diuron	4.3	8.2
Fenamifos	3.3	4.9
Linuron	2.0	4.0
Metolacloro	0.35	1.8
Propanilo	2.3	4.6
Acetona	0.001 % (v/v)	0.01 % (v/v)
Acetonitrilo	0.0001	0.001
Metanol	0.0001	0.001

<sup>a</sup> Mayor cantidad probada que no interfiere.

<sup>b</sup> Menor cantidad probada que interfiere.

Se han probado varios pesticidas, así como algunos posibles disolventes como especies interferentes, y los resultados se presentan en la **Tabla 6**. Las columnas de datos “Tolerado” y “No-Tolerado representan la cantidad más alta probada que no interfiere y la menor que si lo hace respectivamente. Una especie se considera que interfiere cuando la cantidad encontrada de Atrazina difiere de la esperada en más de dos veces la desviación estándar (Ver **Tabla 3**) al nivel de concentración probado. Todas las especies interferentes probadas, excepto el acetonitrilo (ACN) y el metanol, dan reacción positiva, esto es, se encuentra más atrazina que la esperada. La

<sup>43</sup> P. Zuman, R. Patel, *Techniques in Organic Analysis*, Wiley, New York, 1984, p. 66.

interferencia del diurón, fenamifos, linurón y propanilo son mucho menos severas que las del resto de pesticidas de la **Tabla 6**. Estos pesticidas se oxidan significativamente a concentraciones por debajo del nivel dado en la **Tabla 6** (“tolerado”), pero el modelo de calibración es lo suficientemente robusto como para soportar las diferencias de los espectros durante la reacción. Las interferencias del acetonitrilo (ACN) y del metanol son básicamente diferentes porque se comportan como supresores de la reacción inducida, y la concentración encontrada de atrazina es menor que la esperada.

En la determinación de Atrazina en muestras reales pueden encontrarse distintos tipos de interferencias. Por un lado se encuentran interferencias espectrales, que no son muy relevantes cuando únicamente se sigue la variación de la señal (metodología cinética) y por otro, especies que dan reacción con el FR. En principio este último tipo es mucho más relevante, y por ejemplo en análisis medioambiental se encuentran todas las especies orgánicas existentes tales como hidrocarburos, otros pesticidas, disolventes, etc. Efectivamente el FR no es un reactivo selectivo, pero con la quimiometría se pueden aprovechar las diferencias encontradas en los perfiles de reacción entre el analito y los interferentes y de ese modo ganar selectividad.

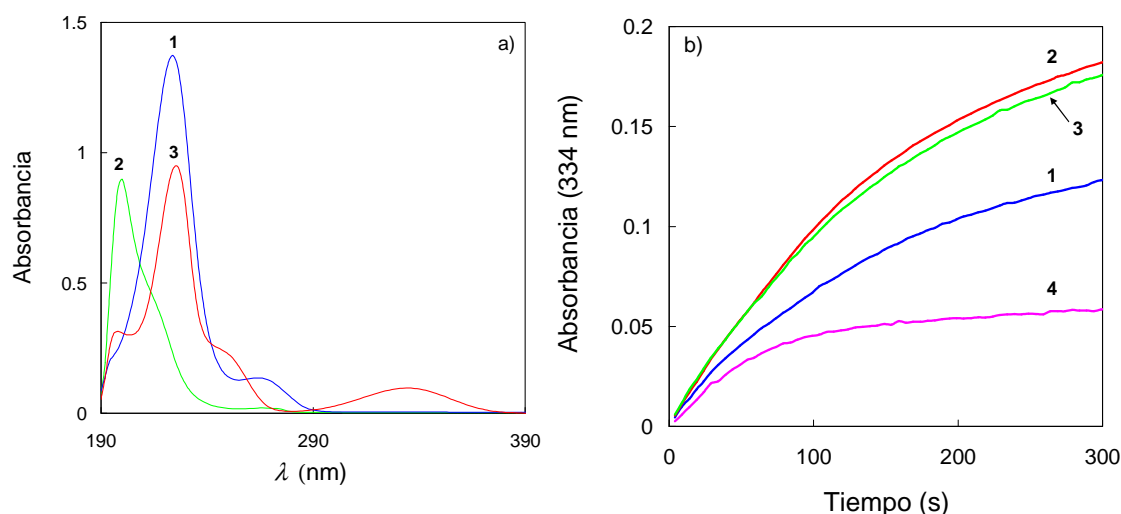
Es conocido que el uso de los métodos de calibración multivariable aplicados a perfiles cinéticos de reacción puede dar origen a una selectividad mejorada<sup>44</sup>, ya que PLS tiene la capacidad de modelar interferencias, siempre que estén incluidas en la serie de calibración<sup>21,45,46</sup>. Para probar esto, se consideró primeramente la inclusión de dos pesticidas procedentes de familias diferentes (Alacloro y Bentazona), en la determinación de Atrazina. Las interferencias espectrales de ambas especies así como la interferencia cinética en la evolución del espectro UV del sistema  $\text{Fe}^{2+}$  -  $\text{H}_2\text{O}_2$  - Atrazina pueden observarse en la siguiente figura (**Figura 6**). Según lo anteriormente comentado, cabe esperar que la inclusión de algunas muestras conteniendo el interferente, en el grupo de calibración pueden hacer que el FR sea útil en la determinación de Atrazina esté o no presente el citado interferente.

---

<sup>44</sup> T. Kappes, G. López-Cueto, J. F. Rodríguez-Medina, C. Ubide; *Improved selectivity in multicomponent determinations through interference modelling by applying partial least squares regression to kinetic profiles*; *Analyst* 123 (1998), 2071 – 2077.

<sup>45</sup> H. Martens, T. Næs; *Multivariate Calibration*; Chichester, 1989, ch. 3.

<sup>46</sup> O. George, H. A. Willis; *Computer Methods in UV, Visible and IR Spectroscopy*; Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1990, p. 55.



**Fig. 6** Interferencia espectral y cinética. a) Espectro UV de: 1) Atrazina, 2) Alacloro y 3) Bentazona. Todos ellos a la concentración de  $2.88 \times 10^{-5}$  M; pH = 4 ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ );  $\text{NaClO}_4 = 1$  M. b) Perfil de reacción de: 1) FR ( $[\text{H}_2\text{O}_2] = 4 \times 10^{-5}$  M,  $[\text{Fe}^{2+}] = 2 \times 10^{-4}$  M, pH = 4 ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ),  $[\text{NaClO}_4] = 1$  M,  $T^a = 25$  °C); 2) FR + Atrazina  $6.03 \times 10^{-5}$  M; 3) FR + Atrazina  $6.03 \times 10^{-5}$  M + Alacloro  $8.36 \times 10^{-5}$  M y 4) FR + Atrazina  $6.03 \times 10^{-5}$  M + Bentazona  $5.42 \times 10^{-5}$  M.

Se realizaron modelos de calibración para la determinación de Atrazina, en los que se incluyen muestras sintéticas de Atrazina en presencia de Alacloro (**Anexo I-3**) y Bentazona (**Anexo I-4**) como interferentes. Los modelos se aplicaron a la determinación de Atrazina en muestras comerciales que contienen Atrazina y otro pesticida (Alacloro o Bentazona) como sustancias activas. No se hizo ningún pretratamiento de las muestras comerciales, aparte de la evaporación del disolvente (ver sección “*experimental*”). Los resultados hallados se encuentran en la siguiente tabla (**Tabla 7**), junto con estudios de recuperación. En el caso de la muestra “*Controler*” el contenido de Atrazina también se determinó mediante Cromatografía de Gases, y el dato aparece en la tabla como referencia.

**Tabla 7.**

Determinación de Atrazina y estudio de recuperación en muestras comerciales mediante el FR. La desviación estándar aparece entre paréntesis (tres replicados).

Muestra	% Atrazina en muestra (p/p)			[Atrazina] x 10 <sup>5</sup> (mol l <sup>-1</sup> )		Recuperado (%)
	Reportado	GC	FR	Añadido	Hallado	
Controler <sup>a)</sup>	18.4	19.9(0.3)	18.2 <sup>b)</sup> (0.7)	1.73	1.4 <sup>b)</sup> (0.2)	81 (10)
				2.23	2.4 <sup>b)</sup> (0.1)	107 (5)
				2.60	2.6 <sup>b)</sup> (0.2)	100 (9)
Laddock <sup>c)</sup>	18.8		18.0 <sup>d)</sup> (0.3)	1.85	1.62 <sup>d)</sup> (0.03)	88 (1)
				2.78	2.6 <sup>d)</sup> (0.2)	94 (1)
				3.09	3.1 <sup>d)</sup> (0.2)	100 (3)

<sup>a)</sup> Sapec Agro, S.A. (Setubal, Portugal). Alacloro, 350 g l<sup>-1</sup>.

<sup>b)</sup> Modelo PLS definido en el Anexo I-3.

<sup>c)</sup> Basf (Ludwigshafen, Germany). Bentazona 200 g l<sup>-1</sup>.

<sup>d)</sup> Modelo PLS definido en el Anexo I-4.

Los resultados fueron satisfactorios para ambas muestras comerciales, y más teniendo en cuenta que en el caso de la muestra “*Laddock*” la sustancia activa que presenta es la sal sódica de la Bentazona, no la sustancia pura.

### 3.4.2. Modelado de la interferencia del disolvente:

La extracción de los pesticidas de muestras medioambientales por lo general se realiza con disolventes orgánicos como, acetona, acetato de etilo, metanol, acetonitrilo, etc., cuyas longitudes de onda de corte son 330, 256, 205 y 190 respectivamente. Todos estos disolventes dan reacción con el FR, por lo que se comportan como interferencias para la determinación individual de Atrazina. Las condiciones óptimas para la determinación de Atrazina en medio acuoso, ya se han visto anteriormente, pero la incorporación de disolventes orgánicos al medio puede hacer variar estas condiciones óptimas, por lo que se volverá a hacer el citado estudio de optimización, incluyendo esta vez el disolvente como nueva variable. Las otras variables que afectan a la reacción serán el pH, la temperatura la  $[\text{Fe}^{2+}]$  y la  $[\text{H}_2\text{O}_2]$ . Dado que esta vez el número de variables se ha incrementado, y con él el número de experimentos a realizar, se planteará un diseño factorial fraccionado ( $2^{5-1}$ ) a modo de *screening*. De entre los posibles disolventes, se han probado metanol y acetonitrilo, dado que presentan una longitud de onda de corte que permite medir la reacción en la zona UV.

El parámetro que se utiliza como factor de respuesta será nuevamente el anteriormente definido  $1 - \rho^{\text{espectral}}$ , siendo  $\rho^{\text{espectral}}$  el coeficiente de correlación lineal entre la señal cuando está presente el analito y cuando no lo está. El valor del parámetro de respuesta teóricamente puede variar entre 0 y 1, siendo los valores más altos aquellos que presentan más diferencias y por tanto mejores condiciones para la determinación. Los experimentos realizados, así como el valor de la respuesta obtenida puede verse en el [Anexo I-5](#). Se incluyen tres replicados del punto central para asegurar que la variabilidad es producto únicamente de la influencia de las variables y no del error experimental.

Tras aplicar análisis de la varianza (ANOVA) a los datos del [Anexo I-5](#) se obtiene la gráfica *pareto* ([Anexo I-6](#)), en la que se observa que tanto el pH, como la  $[\text{Fe}^{2+}]$  y el porcentaje de Metanol son significativos, mientras que la temperatura y la  $[\text{H}_2\text{O}_2]$  no lo son al 95% de significación. Estas dos últimas variables se fijaron siguiendo los criterios que ya se utilizaron anteriormente, y el valor del resto de las variables, utilizando la herramienta del Diseño Central Compuesto (CCD).

De este modo se trabaja a temperatura ambiente (25 °C) que es fácil de controlar, y a una concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  baja ( $4 \times 10^{-5}$  M), para que la reacción pueda seguirse con facilidad y no sea excesivamente rápida. Para la optimización de las otra tres

variables se realizó un *Diseño Central Compuesto Inscrito*<sup>47</sup> ( $\alpha=1.4$ ), de este modo evitando, así, incumplir alguna de las restricciones que anteriormente ya se han apuntado (Figura 7).

Exp	pH	[Fe <sup>2+</sup> ] (10 <sup>5</sup> x mol l <sup>-1</sup> )	% Metanol (v/v)	1- $\rho^{spectral}$
1	1.6	7.24	28.1	0.8658
2	1.6	7.24	51.9	0.8964
3	1.6	16.80	28.1	0.5809
4	1.6	16.80	51.9	0.9203
5	3.4	7.24	28.1	0.6962
6	3.4	7.24	51.9	0.9973
7	3.4	16.80	28.1	0.7521
8	3.4	16.80	51.9	0.9999
9	1.0	12.00	40.0	0.4150
10	4.0	12.00	40.0	1.0000
11	2.5	4.00	40.0	0.9813
12	2.5	20.00	40.0	0.8146
13	2.5	12.00	20.0	0.5615
14	2.5	12.00	60.0	0.9760
15	2.5	12.00	40.0	0.8118
16	2.5	12.00	40.0	0.7008
17	2.5	12.00	40.0	0.9324

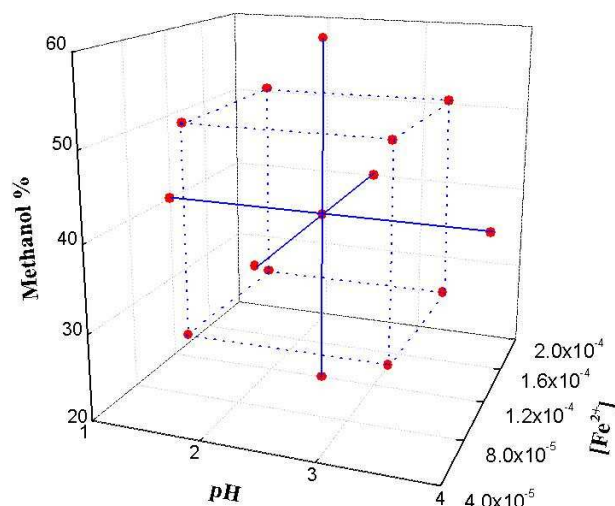


Fig. 7) Valores de las variables en el diseño central compuesto (CCD) y resultado del parámetro de respuesta obtenido ( $1 - \rho^{spectral}$ ). A su lado se encuentra la distribución espacial de los experimentos, que se realizaron en orden aleatorio.

Cuando se estudia el análisis de la varianza del diseño, se observa que la influencia de [Fe<sup>2+</sup>] no es significativa, por lo que se fijó un valor [Fe<sup>2+</sup>] = 2 x 10<sup>-4</sup> M. El valor de las otras dos variables se asignó de acuerdo a la superficie de respuesta obtenida para estas dos variables (Figura 8). De acuerdo con estos resultados se trabajó a un pH = 4, y con una cantidad de Metanol del 60 % en volumen. Valores más altos de estas variables pueden originar la aparición de precipitados. A continuación se presenta un resumen de las condiciones fijadas para cada una de las variables, y que se utilizarán para realizar un calibrado para la determinación de Atrazina, cuando se encuentra disuelta en metanol.

- pH = 4
- % Metanol = 60% en agua (v/v).
- [Fe<sup>2+</sup>] = 2 x 10<sup>-4</sup> M
- T<sup>a</sup> = 25 °C
- [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 4 x 10<sup>-5</sup> M

<sup>47</sup> Richard Verseput; *Digging Into DOE*; <http://www.qualitydigest.com/june01/html/doe.html>; (visto en 2010).



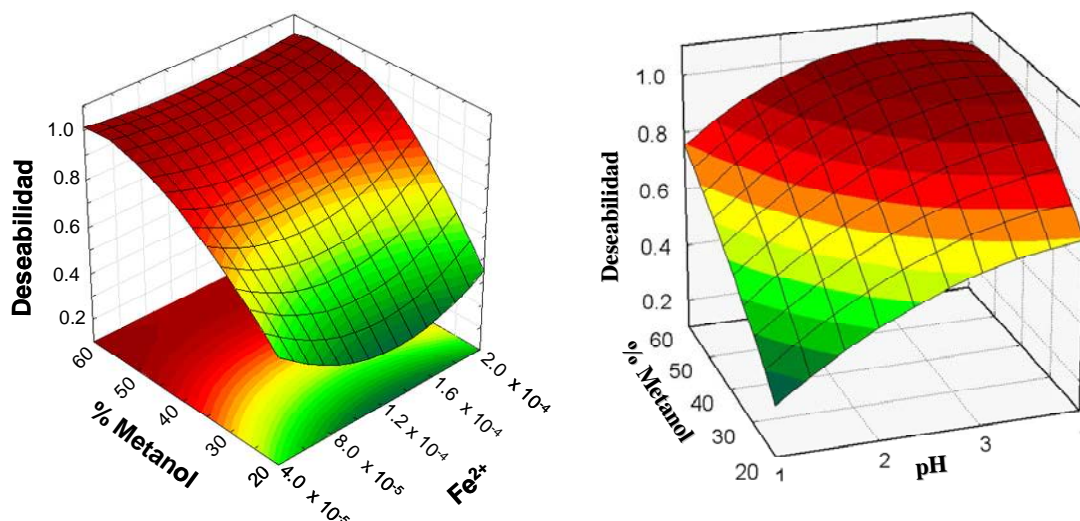


Fig. 8) Superficies de respuesta. Se usa la función “Deseadabilidad”<sup>48,49</sup> obtenida para las variables “pH”, “% Metanol en agua”, y “[Fe<sup>2+</sup>]”, tras la optimización mediante el diseño central compuesto (CCD).

Se realizó un estudio similar utilizando acetonitrilo como disolvente orgánico (Anexo I-7,8), tras el que se obtienen las siguientes condiciones óptimas:

- pH = 4
- % Acetonitrilo = 25% en agua (v/v)
- [Fe<sup>2+</sup>] = 1.2 x 10<sup>-4</sup> M
- T<sup>a</sup> = 40 °C
- [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 1.2 x 10<sup>-4</sup> M

En los dos casos (metanol y acetonitrilo) se realizaron calibrados para la determinación individual de atrazina en las condiciones óptimas que se han descrito. Para evaluar su validez ambos calibrados se aplicaron a la determinación de Atrazina en las muestras comerciales, pero disueltas en ambos disolventes orgánicos respectivamente. Los resultados son satisfactorios cuando el medio de disolución es metanol:agua (60%:40%) (Anexo I-9), mientras que cuando se utiliza acetonitrilo:agua (25%:75%) se observa una clara tendencia a obtener valores altos de Atrazina en las

<sup>48</sup> **Función deseabilidad:** Función que asigna números comprendidos entre 0 y 1 a los posibles valores de respuesta encontrada. En un principio fue ideada para encontrar condiciones óptimas a procesos con múltiples parámetros de respuesta. Cuando el valor de respuesta es un valor desfavorable se le asigna un valor de deseabilidad de 0; Si el valor de la respuesta encontrada es el más favorable se le asigna un valor de 1. De este modo, en este caso se define que la función deseabilidad sea igual a  $1 - \rho^{\text{espectral}}$ .

<sup>49</sup> NIST/SEMATECH; *e-Handbook of Statistical Methods, Cap .5 (Multiple responses: The desirability approach)*. <http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/pri/section5/pri5322.htm>, visto en 2010.

muestras de pesticidas, aunque en las muestras sintéticas y los estudios de recuperación los resultados en general son aceptables (Anexo I-10).

Pueden utilizarse ambos disolventes para realizar los siguientes estudios, pero se ha elegido el metanol por ser más barato, menos tóxico y porque presenta mejores resultados. El mismo procedimiento que se sigue para un caso, bien puede seguirse para el otro, siempre teniendo en cuenta las diferentes condiciones experimentales.

### 3.4.3. Uso del reactivo de Fenton para determinaciones multicomponentes:

Se han visto las posibilidades del FR para la determinación individual de especies, incluso en presencia de interferentes, pero como ya se ha mencionado el FR no es un reactivo selectivo. En química analítica se suele ganar selectividad por separación física de las especies, o bien empleando reactivos altamente selectivos como lo son las enzimas o los anticuerpos. Sin embargo esta posibilidad se amplía con el uso de la quimiometría, cuando se emplean datos de segundo orden espectro-cinéticos para la resolución de mezclas multicomponentes con un mismo reactivo<sup>50</sup>.

Se ha comprobado la utilidad del FR en la determinación de mezclas binarias de pesticidas. Para ello se han empleado las condiciones óptimas halladas anteriormente, es decir en medio metanol : agua. Se realizaron matrices de muestras sintéticas de dos pesticidas (atrazina - alacloro y atrazina - bentazona) y se aplicó PLS como algoritmo de calibración. Los errores individuales en la determinación así como las características de los modelos se dan a continuación en forma resumida (**Tabla 8**). Los resultados detallados se encuentran en los **anexos I-11 y I-12**.

**Tabla 8:**

Rangos de concentración y errores relativos encontrados en la resolución de mezclas binarias sintéticas de Atrazina (ATZ) con Alacloro (ALC) y Bentazona (BTZ) respectivamente. Todos los datos fueron centrados.

Mezcla	LV	Nº de Muestras	Rangos de concentración (x 10 <sup>5</sup> mol l <sup>-1</sup> )			RE (%)		
			ATZ	ALC	BTZ	ATZ	ALC	BTZ
ATZ-BTZ <sup>a</sup>	7-7	22 <sup>b</sup>	1.50 - 10.0		1.51 - 10.0	3.2 <sup>b</sup>		1.4 <sup>b</sup>
		19 <sup>c</sup>	1.50 - 10.0		1.56 - 10.0	6.1 <sup>c</sup>		5.1 <sup>c</sup>
ATZ-ALC	3-3	15 <sup>b</sup>	1.50 - 7.50	1.50-7.50		4.1 <sup>b</sup>	5.0 <sup>b</sup>	
		13 <sup>c</sup>	1.50 - 7.50	1.50-7.50		3.5 <sup>c</sup>	4.8 <sup>c</sup>	

<sup>a)</sup> Para el modelado de bentazona los datos se autoescalaron.

<sup>b)</sup> Muestras en el grupo de calibración.

<sup>c)</sup> Muestras en el grupo de validación.

Los modelos realizados se aplicaron a la resolución de muestras comerciales que constan de mezclas de los pesticidas. El FR ya se había probado en este tipo de muestras comerciales, pero no se había empleado para determinaciones multicomponentes. Tras

<sup>50</sup> G. López – Cueto, M. Ostra, C. Ubide; *The acetylsalicylic acid – bromine system for multicomponent kinetic determinations*; Anal. Bioanal. Chem., 374 (2002), 915.

una dilución adecuada, los modelos se aplicaron a las muestras sin ningún otro tipo de pretratamiento. Los resultados encontrados se presentan en la **Tabla 9** junto con algunos estudios de recuperación.

<b>Tabla 9:</b> Determinación multicomponente de atrazina, alacloro y bentazona en mezclas binarias de muestras comerciales, y estudio de recuperación. Se aplicaron los modelos de la <b>Tabla 8</b> . Entre paréntesis se da la desviación estándar encontrada al medir tres replicados.						
Muestra	Pesticida	Contenido (%)		[Pesticida] x 10 <sup>5</sup> mol l <sup>-1</sup>		Recuperado (%)
		Reportado	Hallado	Añadido	Hallado	
Controler <sup>a)</sup>	Atrazina	18.4	19 (2)	1.80	1.6 (0.2)	89 (9)
				3.00	2.8 (0.3)	93 (11)
				3.20	2.6 (0.4)	82 (14)
	Alacloro	32.3	34 (2)	2.00	1.8 (0.2)	90 (9)
				3.00	2.6 (0.4)	87 (13)
				3.80	3.5 (0.6)	92 (16)
Ladock <sup>b)</sup>	Atrazina	18.8	13.0(0.3)	2.13	1.93 (0.07)	91 (3)
				4.38	4.6 (0.2)	105 (5)
				2.50	2.2 (0.1)	88 (6)
	Bentazona	18.8	19 (2)	2.13	2.1 (0.2)	99 (10)
				4.00	4.2 (0.4)	105 (11)
				4.38	4.8 (0.5)	110 (11)

<sup>a)</sup> Sapec Agro, S.A. (Setubal, Portugal). Alachlor, 350 g l<sup>-1</sup>; Atrazine 200 g l<sup>-1</sup>

<sup>b)</sup> Basf (Ludwigshafen, Alemania). Bentazone 200 g l<sup>-1</sup>; Atrazine 200 gl<sup>-1</sup>

En general los resultados pueden considerarse satisfactorios, excepto para el caso de Atrazina en la muestra de “*Ladock*”, que se halla en defecto. Es posible que se deba a algún tipo de interferencia cinética de la matriz pero que no afecte al comportamiento de la atrazina, ya que las recuperaciones son adecuadas. Sin embargo, esta magnitud en el error suele aceptarse generalmente en determinadas circunstancias<sup>51</sup>. Siempre se obtuvieron estudios de recuperación aceptables, aunque puede apreciarse una tendencia en el caso de “*Controler*” a dar recuperaciones bajas.

<sup>51</sup> AOAC Official Methods of Analysis, *Pesticide and Industrial Chemical Residues*, 1995, Ch 10, pp. 26 - 31 (method 991.07).

#### 3.4.4. Determinación de atrazina en aguas:

La máxima concentración de Atrazina permitida/aceptada en aguas potables se extiende entre  $0.1 \mu\text{g l}^{-1}$  en el caso de la Unión Europea<sup>52</sup> (EU) y  $3 \mu\text{g l}^{-1}$  para la Agencia de Protección Medioambiental de los E.E.U.U.<sup>53</sup> (EPA) o  $5 \mu\text{g l}^{-1}$  para el departamento Federal de Canadá, responsable de ayudar a sus ciudadanos a conservar y mejorar su salud, “*Health Canada*”<sup>54</sup>.

La determinación de pesticidas por lo general se realiza mediante cromatografía de gases (GC) o de líquidos (HPLC), aparte de por otras técnicas no tan utilizadas como la electroforesis capilar (CE) o métodos basados en anticuerpos<sup>55</sup>. Únicamente éstos últimos son capaces de detectar tan bajos niveles de concentración, necesitando el resto una etapa de preconcentración de la muestra. Uno de los métodos más empleados para la preconcentración es la llamada extracción en fase sólida (SPE).

En nuestro caso se escogió una fase sólida compuesta por  $\text{C}_{18}$  y metanol como eluyente, de acuerdo con algunos otros precedentes<sup>56</sup>. Se pudo comprobar que con disoluciones de Atrazina en agua bidestilada, y siguiendo las indicaciones que aconseja el fabricante, los discos de SPE podían reutilizarse hasta unas seis veces, con recuperaciones superiores al 90 %.

El procedimiento que se sigue es el que se explica en la sección “*Experimental*”, y las condiciones para la reacción con el FR, las óptimas que se encontraron para la mezcla metanol: agua (60%: 40%). Se realizó un modelo de calibrado en el que se incluyeron muestras sintéticas de Atrazina en agua bidestilada y además se incluyeron tres niveles de agua de grifo y mineral respectivamente enriquecidas con Atrazina pura. Los errores individuales así como las características del modelo se presentan en la siguiente tabla (**Tabla 10**).

---

<sup>52</sup> Council Directive 98/83/EC on the quality of water intended for human consumption, adopted on 3 November 1998, L 330/32. Official Journal of the European Communities 5.12.98.

<sup>53</sup> U.S. Environmental Protection Agency, *Drinkingwater contaminants*; <http://www.epa.gov/safewater/mcl.html>, Visto en 2010.

<sup>54</sup> Health Canada, Environmental Workplace Health, Atrazine, <http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/pubs/water-eau/atrazine/index-eng.php>, (visto en 2010).

<sup>55</sup> J. L. Tadeo, C. Sánchez-Brunete, B. Albero, L. González; *Analysis of pesticide residues in juice and beverages*; Crit. Rev. Anal. Chem. 34 (2004) 165-175.

<sup>56</sup> M. Khrolenko, P. Dzygiel, P. Wiczorek; *Combination of supported liquid membrane and solid-phase extraction for sample pretreatment of triazine herbicides in juice prior to capillary electrophoresis determination*; J. Chromatogr. A, 975 (2002) 219-227.

**Tabla 10:** Errores en la determinación de Atrazina en muestras de aguas potables enriquecidas con el pesticida. Las muestras se hacen pasar por discos de extracción según el procedimiento indicado en la sección “*Experimental*” (Figuras 1 y 2). Una vez eluidas se miden según el procedimiento de muestras sintéticas en metanol : agua (60 %: 40%).

Muestra <sup>a)</sup>	[Atrazina] x 10 <sup>7</sup> mol l <sup>-1</sup>			Muestra <sup>c)</sup>	[Atrazina] x 10 <sup>7</sup> mol l <sup>-1</sup>		
	Puesto	Hallado <sup>b)</sup>	Error (%)		Puesto	Hallado <sup>b)</sup>	Error (%)
1	0.19	0.14	-26.3	16	0.83	0.92	10.3
2 <sup>d)</sup>	0.28	0.26	-7.1	17 <sup>d)</sup>	1.39	1.32	-5.0
3 <sup>e)</sup>	0.30	0.35	16.7	18	1.58	1.40	-11.4
4	0.51	0.51	-	19	2.32	2.43	4.7
5	1.21	1.24	2.5	20 <sup>e)</sup>	3.06	3.00	-2.0
6	1.95	1.97	1.0	21	3.80	3.79	-0.3
7 <sup>e)</sup>	2.32	2.31	-0.4	22 <sup>d)</sup>	4.54	4.46	-1.8
8	2.69	2.63	-2.2	23	5.28	5.38	1.9
9 <sup>d)</sup>	3.24	3.24	-				
10	3.43	3.56	3.8				
11	4.17	4.11	-1.4				
12 <sup>d)</sup>	4.64	4.61	-0.6				
13	4.91	4.85	-1.2				
14 <sup>e)</sup>	5.56	5.57	0.2				$RE_{cal} = 1.5 \%$
15	5.65	5.70	0.9				$RE_{val} = 3.0 \%$

<sup>a)</sup> Grupo de muestras de calibración.

<sup>b)</sup> Modelo PLS creado con 6 LVs. Datos autoescalados. Variables: 206-270 nm cada 4 nm; Tiempo 4-304 s cada 5 s.

<sup>c)</sup> Grupo de muestras de validación.

<sup>d)</sup> Agua de grifo proveniente la Estación de Tratamiento de Agua Potable de Arriaran (Beasain), España.

<sup>e)</sup> Agua mineral natural “Veri” (Bisauri), España.

Se realizó un estudio independiente para conocer la precisión del modelo. Para ello se tomaron 6 muestras de aguas potables enriquecidas con atrazina ( $2.67 \times 10^{-7}$  M) y se siguió todo el procedimiento para cada una de ellas. Las medidas se realizaron en diferentes jornadas de trabajo, y aleatoriamente con discos nuevos y reutilizados. Los resultados de este estudio se presentan resumidamente en la siguiente tabla (**Tabla 11**).

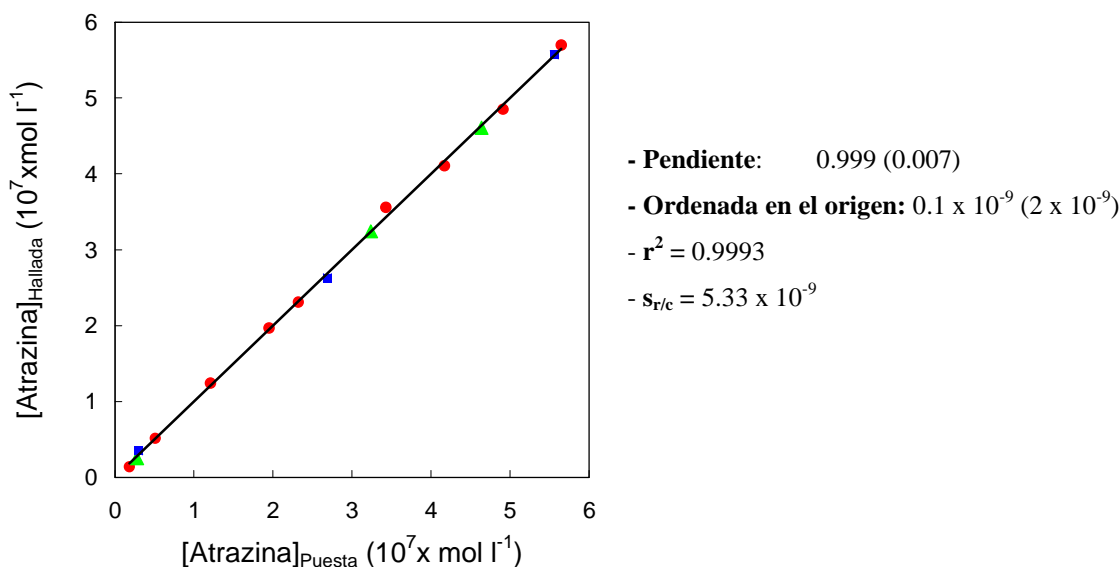
**Tabla 11:** Estudio de la precisión del modelo creado en la **tabla 10**.

[Atrazina] x 10 <sup>7</sup> mol l <sup>-1</sup>				
Puesto	Media Hallada	$\sigma$	Intervalo de Confianza <sup>a)</sup>	Error (%)
2.69	2.61 <sup>b)</sup>	0.09 <sub>8</sub>	2.41 – 2.81	3.8

<sup>a)</sup> Valor medio  $\pm 2 \sigma$ .

<sup>b)</sup> Valor medio de 6 repeticiones realizadas en 6 sesiones durante 6 días.

El límite de detección estadístico (L.O.D.) está bien definido para situaciones en las que físicamente existe una recta de calibrado (señal vs. concentración), pero en nuestro caso, la señal analítica es un grupo de espectros tomados a lo largo el tiempo, y se aplica un método de calibración multivariable. Se han realizado numerosas propuestas para este tipo de métodos <sup>57</sup> y en una de ellas, se utiliza una representación de concentración hallada por el modelo frente a concentración puesta, para realizar una estimación del límite de detección multivariable <sup>58</sup> Siguiendo la misma idea se realiza una representación del puesto vs. hallado en nuestras muestras de calibración (**Figura 9**).



**Fig. 9:** Representación “hallado vs. puesto” para los datos del grupo de calibración de la **Tabla 10**. A su derecha se dan las características de la recta de regresión. ● Muestras en agua bidestilada; ▲ Muestras en agua de grifo (Arriaran); ■ Muestras en agua mineral (Veri).

<sup>57</sup> A. C. Oliveri, N. M. Faber, J. Ferré, R. Boqué, J. H. Kalivas, H. Mark; *Uncertainty estimation and figures of merit for multivariate calibration*; Pure Appl. Chem., 78 (3), 2006, 633-661.

<sup>58</sup> M. C. Ortiz, L. A. Sarabia, A. Herrero, M. S. Sánchez, M. B. Sanz, M. E. Rueda, D. Giménez, M. E. Meléndez; *Capability of detection of an analytical method evaluating false positive and false negative (ISO 11843) with partial least squares*; Chemometr. Intell. Lab. Syst., 69 (2003) 21-33.

El valor hallado para la desviación estándar de los residuales ( $s_{r/c}$ ) es  $5.33 \times 10^{-9}$  y siguiendo el criterio  $3 s^{59}$ , para la representación de la **figura 9**, se obtiene una estimación del límite de detección siguiente:

$$\text{L.O.D.} = 3 s_{r/c} / \text{pendiente} = 1.6 \times 10^{-8} \text{ mol l}^{-1} (3.4 \mu\text{g l}^{-1})$$

Obviamente este límite de detección estimado debería tomarse con cautela, y únicamente como orientativo, ya que esta última propuesta requeriría de mayor validación. El rango de aplicación de este método podría extenderse hasta por lo menos  $5 \times 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$  ( $115 \mu\text{g l}^{-1}$ ).

El modelo de calibración se empleó para la determinación de Atrazina en muestras enriquecidas de agua de grifo (Añarbe) y mineral (Mondariz) diferentes a las utilizadas en el modelo y también en un agua de referencia certificada (Chicago 94, National Water Research Institute of Canada) con un contenido relativamente alto de materia inorgánica y orgánica disuelta ( $26.3 \text{ mg l}^{-1}$  y  $1.4 \text{ mg l}^{-1}$  respectivamente). Los resultados se presentan en la siguiente tabla (**Tabla 12**).

**Tabla12:** Determinación de Atrazina en muestras de agua enriquecidas empleando el modelo de la **Tabla 10**. Entre paréntesis se dan los valores de las desviaciones estándar.

Agua	Exp.	[Atrazina] ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )		(% Recuperado)
		Puesto	Hallado	
Grifo <sup>a)</sup>	1	-	6 <sup>b)</sup> (8)	-
	2	20.0	25 <sup>b)</sup> (2)	125
	3	58.0	58 <sup>b)</sup> (7)	100
Mineral <sup>c)</sup>	4	-	8 <sup>b)</sup> (2)	-
	5	20.0	22 <sup>b)</sup> (3)	110
	6	58.0	54 <sup>b)</sup> (1)	93.1
Chicago 94 <sup>d, e)</sup>	7	23.1	26 <sup>f)</sup> (5)	112
	8	70.1	73 <sup>f)</sup> (6)	105

<sup>a)</sup> Agua de grifo procedente de la Mancomunidad de aguas del Añarbe (San Sebastián), España.

<sup>b)</sup> Tres replicados.

<sup>c)</sup> Agua mineral natural "Mondariz" (Mondariz), España.

<sup>d)</sup> Agua procedente de Chicago (E.E.U.U.) y referenciada por el National Water Research Institute de Canadá.

<sup>e)</sup> Debido a la cantidad limitada disponible de esta agua, solo se pasaron 200 ml (en lugar de 1 litro) a través de los discos de  $C_{18}$  cada vez.

<sup>f)</sup> Cuatro replicados correspondientes a las dos muestras pasadas por los discos de  $C_{18}$  (dos cada vez).

<sup>59</sup> J. N. Miller, J.C. Miller; *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, 4th ed.; Prentice Hall, Harlow, 2000, p 122.



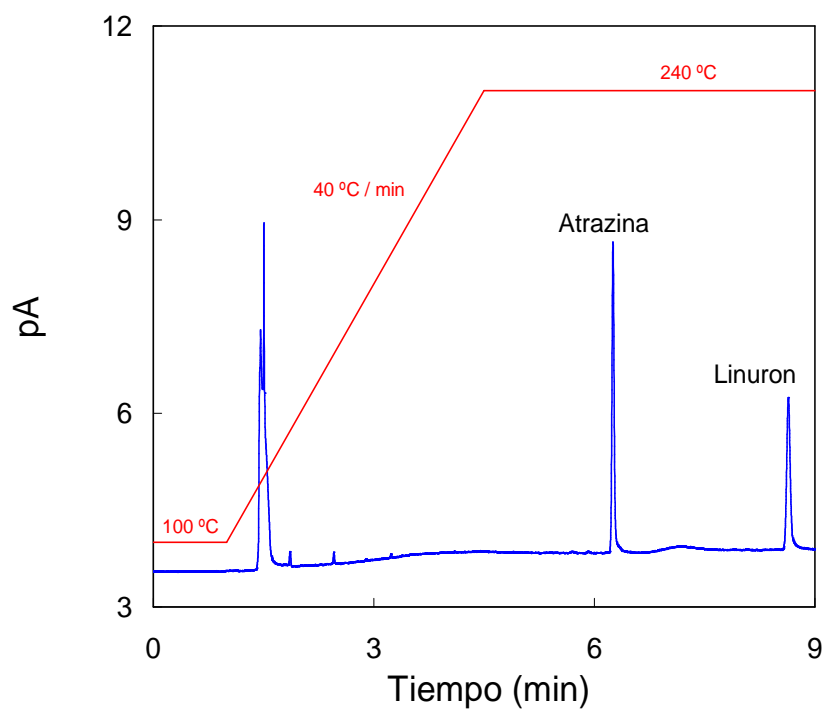
Se ha comprobado que el mismo modelo ha valido para ser aplicado a aguas con diferentes matrices (grifo, agua mineral, etc.) de diferentes procedencias y con una precisión y exactitud apreciable. Excepto en uno de los casos (agua de grifo “Añarbe”, 125 % recuperado) el estudio de recuperación ha sido satisfactorio, y los resultados coinciden con algunas de las recomendaciones dadas como criterios de validación dentro de un laboratorio para el análisis de residuos de pesticidas<sup>60</sup>. Cuando no se añadió Atrazina a las muestras de agua (agua de grifo “Añarbe” y mineral “Mondariz”), se encontró cierta respuesta en la determinación del pesticida, pero la desviación estándar comparada con la cantidad encontrada es muy alta (ver **Tabla 12**), debido a que se está en la zona del límite del intervalo de aplicación y, por lo tanto los resultados deben tomarse con cautela.

#### 4. CONCLUSIONES

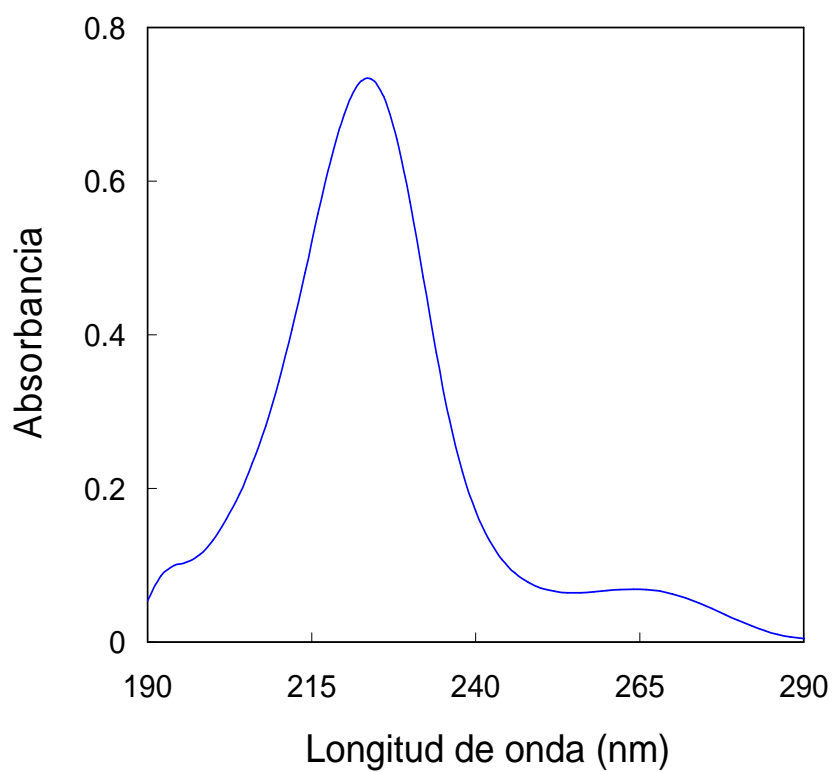
El uso de la metodología cinética, junto con la calibración multivariable, pueden introducir en los sistemas químicos un aumento de la capacidad discriminante para hacer competitivos el uso de reactivos generales (en este caso el reactivo de Fenton) en la determinación de especies químicas y en la resolución de mezclas de las mismas.

---

<sup>60</sup> A. Fajgel, A. Ambrus (eds), *Principles and Practices of Method Validation*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2000, p. 185.



Anexo I-1) Cromatograma obtenido de la muestra "Atrakey" incluido el patrón interno Linuron. También puede observarse el gradiente de temperatura.  $T^{\text{a}}_{\text{inyección}} = 200\text{ °C}$ ,  $T^{\text{a}}_{\text{detección}} = 240\text{ °C}$ .



Anexo I-2) Espectro de Atrazina  $2.32 \times 10^{-5}\text{ M}$  en disolución de  $\text{NaClO}_4\text{ 1 M}$  a  $\text{pH} = 4$  ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ).

**Anexo I-3)** Errores en la determinación de Atrazina en presencia de Alacloro como interferente cuando se aplica PLS como modelo de calibración<sup>a</sup>.

Muestra	$10^5 \text{ mol l}^{-1}$			
	Puesto		Hallado	
	Atrazina	Alacloro	Atrazina	Error (%)
1 <sup>b</sup>	0.46	-	0.36	-21.7
2 <sup>b</sup>	1.4	-	1.4	-
3 <sup>b</sup>	1.6	1.5	1.8	12.5
4 <sup>b</sup>	3.2	-	3.3	3.1
5 <sup>b</sup>	4.2	-	4.2	-
6 <sup>b</sup>	5.1	-	5.2	2.0
7 <sup>b</sup>	5.8	8.6	5.5	-5.2
8 <sup>b</sup>	6.0	2.0	5.8	-3.3
9 <sup>b</sup>	6.0	-	6.1	1.7
10 <sup>b</sup>	7.9	-	8.0	1.3
11 <sup>b</sup>	8.8	-	8.5	-3.4
12 <sup>b</sup>	9.7	-	9.7	-
13 <sup>b</sup>	9.9	0.99	10.0	1.0
14 <sup>b</sup>	11.6	-	11.7	0.9
15 <sup>b</sup>	13.4	-	13.5	0.7
16 <sup>c</sup>	1.5	4.9	1.3	-13.3
17 <sup>c</sup>	2.3	-	2.3	-
18 <sup>c</sup>	6.0	8.4	6.0	-
19 <sup>c</sup>	6.0	0.99	6.0	-
20 <sup>c</sup>	7.0	-	6.9	-1.4
21 <sup>c</sup>	9.9	7.4	10.1	2.0
22 <sup>c</sup>	10.7	-	10.7	-
23 <sup>c</sup>	12.5	-	12.9	3.2
			RE <sub>cal</sub>	2.0 %
			RE <sub>val</sub>	2.2 %

<sup>a</sup> Datos autoescalados. Modelo de PLS definido con 4 LVs.

<sup>b</sup> Grupo de calibración.

<sup>c</sup> Grupo de validación

**Anexo I-4)** Errores en la determinación de Atrazina en presencia de Bentazona como interferente cuando se aplica PLS como modelo de calibración<sup>a</sup>.

Muestra	10 <sup>5</sup> mol l <sup>-1</sup>			
	Puesto		Hallado	
	Atrazina	Bentazona	Atrazina	Error (%)
<b>1<sup>b</sup></b>	0.46	-	0.39	-15
<b>2<sup>b</sup></b>	0.77	7.66	0.80	3.9
<b>3<sup>b</sup></b>	2.32	-	2.50	7.8
<b>4<sup>b</sup></b>	4.17	-	4.27	2.4
<b>5<sup>b</sup></b>	4.64	7.16	4.58	-1.3
<b>6<sup>b</sup></b>	6.03	-	5.72	-5.1
<b>7<sup>b</sup></b>	6.19	1.98	6.15	-0.6
<b>8<sup>b</sup></b>	7.88	-	8.01	1.6
<b>9<sup>b</sup></b>	9.74	-	9.79	0.5
<b>10<sup>b</sup></b>	9.90	0.99	9.99	0.9
<b>11<sup>b</sup></b>	11.60	-	11.50	-0.9
<b>12<sup>b</sup></b>	13.40	-	13.50	0.7
<b>13<sup>c</sup></b>	1.39	-	1.42	2.2
<b>14<sup>c</sup></b>	1.93	6.42	1.38	-28
<b>15<sup>c</sup></b>	3.25	-	3.19	-1.8
<b>16<sup>c</sup></b>	5.10	-	5.00	-2.0
<b>17<sup>c</sup></b>	5.80	3.70	5.45	-6.0
<b>18<sup>c</sup></b>	6.95	-	7.07	1.7
<b>19<sup>c</sup></b>	8.51	1.24	8.17	-4.0
<b>20<sup>c</sup></b>	8.81	-	8.94	1.5
<b>21<sup>c</sup></b>	10.70	-	10.60	-0.9
<b>22<sup>c</sup></b>	12.50	-	13.10	4.8
			RE <sub>cal</sub>	1.7 %
			RE <sub>val</sub>	4.2 %

<sup>a</sup> Datos centrados. Modelo de PLS definido con 5 LVs.

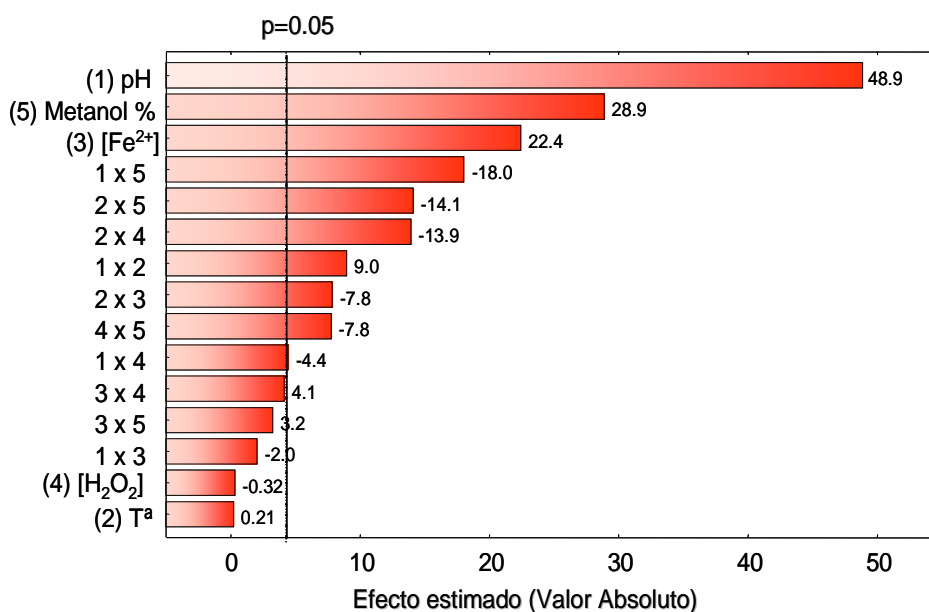
<sup>b</sup> Grupo de calibración.

<sup>c</sup> Grupo de validación

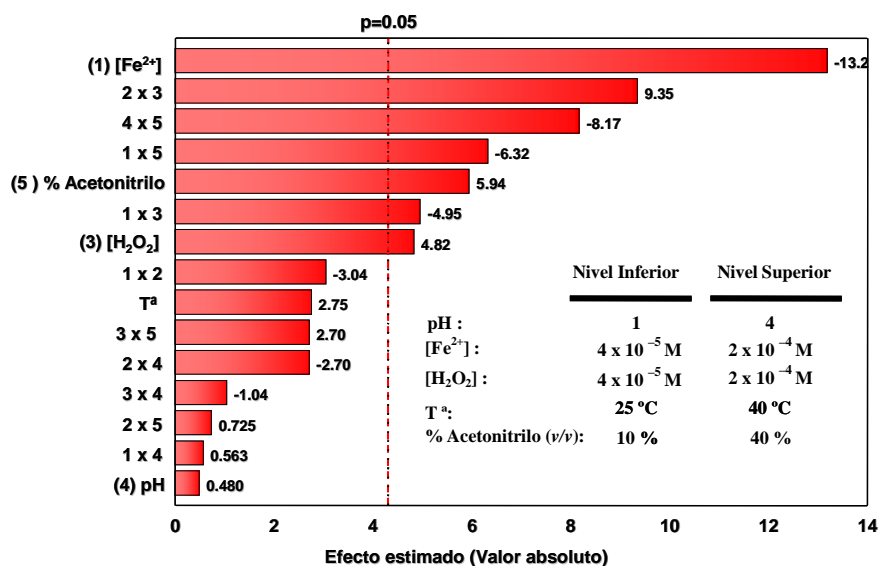
**Anexo I-5** Valores de las variables experimentales en el diseño factorial fraccionado ( $2^{5-1}$ ), y valor de la respuesta obtenida ( $1 - \rho^{espectral}$ )<sup>a</sup> para cada caso. Todos los experimentos se realizaron en orden aleatorio.

Exp.	pH	T (°C)	$10^5 \times \text{mol l}^{-1}$		% Metanol	$1 - \rho^{espectral}$
			Fe <sup>2+</sup>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		
1	1	25	20	4	20	0.0822
2	1	40	20	20	20	0.2104
3	1	25	4	4	60	0.4676
4	1	40	20	4	60	0.6061
5	1	25	20	20	60	0.9020
6	1	40	4	20	60	0.2516
7	1	25	4	20	20	0.0513
8	1	40	4	4	20	0.1032
9	4	25	20	20	20	0.8542
10	4	40	4	20	20	0.7410
11	4	25	4	20	60	0.7102
12	4	25	20	4	60	0.9954
13	4	40	20	4	20	0.9327
14	4	40	20	20	60	0.7947
15	4	25	4	4	20	0.4566
16	4	40	4	4	60	0.8958
17	2.5	32.5	12	12	40	0.3894
18	2.5	32.5	12	12	40	0.3539
19	2.5	32.5	12	12	40	0.3832

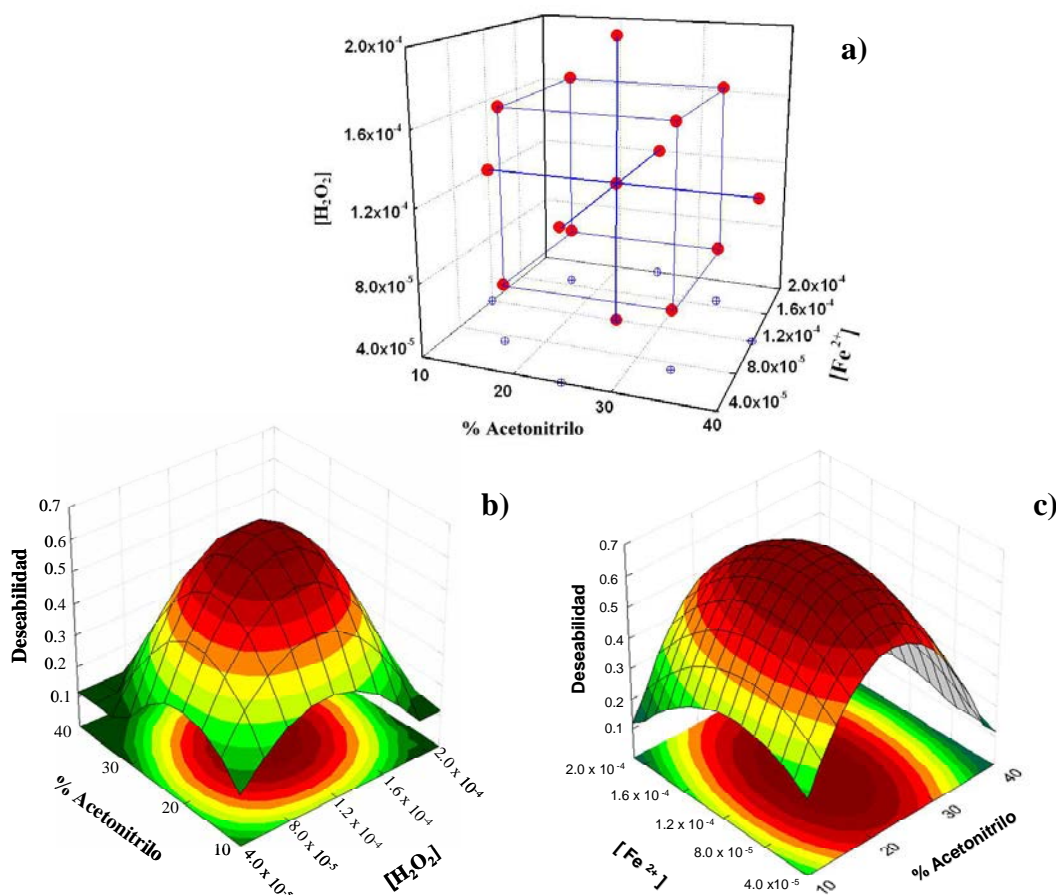
<sup>a</sup> Coeficiente de correlación espectral (ver texto)



**Anexo I-6** Gráfica *pareto* de los efectos obtenida a partir del análisis de la varianza de los datos del diseño factorial fraccionado ( $2^{5-1}$ ).



**Anexo I-7)** Niveles probados para cada una de las variables experimentales en el diseño factorial fraccionado ( $2^{5-1}$ ) y grafica *pareto* de los resultados del diseño. En el diseño se incluyen tres replicados del punto central para evaluar el error experimental. Las variables que influyen significativamente en la respuesta son  $[Fe^{2+}]$ ,  $[H_2O_2]$  y % Acetonitrilo en agua. Como la  $T^a$  y el pH no son significativos, se fijaron en los siguientes valores: pH = 4;  $T^a$  = 40 °C.



**Anexo I-8)** Diseño central compuesto (CCD) para las variables  $[Fe^{2+}]$ ,  $[H_2O_2]$  y % Acetonitrilo en agua. a) Puntos experimentales del CCD Inscrito ( $\alpha = 1.4$ ), también se incluyen dos réplicas del punto central; b) Superficie de respuesta y función de *deseabilidad* para las variables  $[H_2O_2]$  y % Acetonitrilo; c) Superficie de respuesta y función de *deseabilidad* para las variables  $[Fe^{2+}]$  y % Acetonitrilo.

**Anexo I-9) Metanol : Agua (60 % : 40 %)**

**A) Errores encontrados en la determinación de Atrazina en las muestras de calibración y validación cuando se determinan con el FR en las condiciones óptimas descritas en el apartado “Modelado De La Interferencia Del Disolvente”**

Muestra	[Atrazina] x 10 <sup>5</sup> mol l <sup>-1</sup>			Muestra	[Atrazina] x 10 <sup>5</sup> mol l <sup>-1</sup>		
	Puesto	Hallado	Error (%)		Puesto	Hallado	Error (%)
1 <sup>b</sup>	0.5	0.8	60	9 <sup>c</sup>	1.4	1.4	-
2 <sup>b</sup>	2.3	2.0	-13	10 <sup>c</sup>	3.2	3.0	- 6.3
3 <sup>b</sup>	4.2	4.3	2.4	11 <sup>c</sup>	5.1	5.2	2.0
4 <sup>b</sup>	6.0	5.7	-5.0	12 <sup>c</sup>	7.0	7.4	5.7
5 <sup>b</sup>	7.9	8.1	2.5	13 <sup>c</sup>	8.8	9.1	3.4
6 <sup>b</sup>	9.7	9.6	-1.0	14 <sup>c</sup>	10.7	10.4	- 2.8
7 <sup>b</sup>	11.6	11.6	-	15 <sup>c</sup>	12.5	12.0	- 4.0
8 <sup>b</sup>	13.4	13.4	-				
						RE <sub>cal</sub>	2.5%
						RE <sub>val</sub>	3.8%

<sup>a</sup> Modelo PLS definido con 3 LVs. Datos autoescalados.

<sup>c</sup> Grupo de calibración.

<sup>v</sup> Grupo de validación.

**B) Errores encontrados en la determinación de Atrazina en muestras comerciales disueltas en metanol, cuando se determinan con el FR según el modelo descrito anteriormente.**

Muestra	% Atrazina en muestra (p/p)			[Atrazina] x 10 <sup>5</sup> (mol l <sup>-1</sup> )		
	Reportado	GC	FR	Añadido	Hallado	Recuperado (%)
Agrecina A LA <sup>a)</sup>	43.0	42(2)	53 (3)	2.47	2.4 (0.1)	97 (6)
				4.20	4.1 (0.2)	98 (6)
				4.79	5.0 (0.4)	104 (8)
Atrakey <sup>b)</sup>	43.5	43(2)	44 (1)	1.95	2.06 (0.07)	106 (4)
				4.17	4.3 (0.2)	103 (6)
				7.28	7.4 (0.2)	102 (3)
Azinex FLO <sup>c)</sup>	42.8	38(3)	47 (2)	2.84	3.2 (0.2)	113 (7)
				4.31	4.3 (0.2)	100 (5)
				5.84	6.3 (0.3)	108 (5)
Atrazerba FL <sup>d)</sup>	45.0	41(2)	44 (2)	2.09	2.0 (0.1)	96 (5)
				4.08	4.4 (0.3)	108 (7)
				7.42	7.8 (0.4)	105 (6)

<sup>a)</sup> Calliope S.A.S. (Nogueres, Francia).

<sup>b)</sup> Seis replicados durante dos sesiones diferentes.

<sup>c)</sup> Industrial Química Key, S.A. (Tarragona, España).

<sup>d)</sup> Aragonesas Agro, S.A. (Humanes de Madrid, España).

<sup>e)</sup> Sapec Agro, S.A. (Reus, España).

**Anexo I-10)** Acetonitrilo : Agua (25 % : 75 %)

A) Errores encontrados en la determinación de Atrazina en las muestras de calibración y validación cuando se determinan con el FR en las condiciones óptimas descritas en el apartado

[Atrazina] x 10 <sup>5</sup> mol l <sup>-1</sup>				[Atrazina] x 10 <sup>5</sup> mol l <sup>-1</sup>			
Muestra	Puesto	Hallado	Error (%)	Muestra	Puesto	Hallado	Error (%)
1 <sup>b</sup>	0.5	0.9	85	9 <sup>c</sup>	1.4	1.3	-7.2
2 <sup>b</sup>	2.3	2.4	2.6	10 <sup>c</sup>	3.2	3.2	-2.2
3 <sup>b</sup>	4.2	3.6	-12.9	11 <sup>c</sup>	5.1	4.4	-13.1
4 <sup>b</sup>	6.0	5.7	-6.0	12 <sup>c</sup>	7.0	6.6	-4.7
5 <sup>b</sup>	7.9	8.0	1.3	13 <sup>c</sup>	8.8	8.0	-8.7
6 <sup>b</sup>	9.7	10.4	6.8	14 <sup>c</sup>	10.7	11.5	7.5
7 <sup>b</sup>	11.6	11.6	-	15 <sup>c</sup>	12.5	12.3	-1.6
8 <sup>b</sup>	13.4	13.0	-3.0				
						RE <sub>cal</sub>	4.7 %
						RE <sub>val</sub>	6.5 %

<sup>a</sup> Modelo PLS definido con 3 LVs. Muestras autoescaladas.

<sup>c</sup> Grupo de calibración.

<sup>v</sup> Grupo de validación.

“Modelado De La Interferencia Del Disolvente”.

B) Errores encontrados en la determinación de Atrazina en muestras comerciales disueltas en acetonitrilo, cuando se determinan con el FR según el modelo descrito anteriormente.

Muestra	% Atrazina en muestra (p/p)			[Atrazina] x 10 <sup>5</sup> (mol l <sup>-1</sup> )		
	Reportado	GC	FR	Añadido	Hallado	Recuperado (%)
Agrecina A LA <sup>a)</sup>	43.0	42 (2)	62 (1)	3.25	3.4 (0.1)	105 (3)
				5.07	5.5 (0.2)	108 (3)
				5.56	6.3 (0.2)	113 (3)
Atrakey <sup>b)</sup>	43.5	43 (2)	58 (2)	3.80	4.0 (0.2)	105 (5)
				5.13	5.8 (0.3)	113 (5)
				7.11	8.2 (0.4)	115 (6)
Azinex FLO <sup>c)</sup>	42.8	38 (3)	56.9 (0.5)	4.02	4.3 (0.1)	107 (4)
				4.64	5.3 (0.1)	114 (3)
				6.31	7.1 (0.1)	112 (2)
Atrazerba FL <sup>d)</sup>	45.0	41 (2)	60 (4)	2.60	2.5 (0.2)	96 (7)
				4.88	5.7 (0.4)	117 (7)
				6.68	7.4 (0.4)	111 (7)

<sup>a)</sup> Calliope S.A.S. (Nogueres, Francia).

<sup>b)</sup> Seis replicados durante dos sesiones diferentes.

<sup>c)</sup> Industrial Química Key, S.A. (Tarragona, España).

<sup>d)</sup> Aragonesas Agro, S.A. (Humanes de Madrid, España).

<sup>e)</sup> Sapec Agro, S.A. (Reus, España).



**Anexo I-11:** Errores en la determinación de Atrazina y Bentazona en las muestras de calibración y validación cuando reaccionan con el FR en medio Metanol : Agua (60 % : 40%), en las condiciones óptimas establecidas en el punto “Uso Del Reactivo De Fenton Para Determinaciones Multicomponentes”

Muestra	[Atrazina] ( $10^5 \text{ mol l}^{-1}$ )		Error (%)	[Bentazona] ( $10^5 \text{ mol l}^{-1}$ )		Error (%)
	Puesto	Hallado <sup>c)</sup>		Puesto	Hallado <sup>d)</sup>	
1 <sup>a)</sup>	1.50	1.37	-8.9	1.56	1.58	1.5
2 <sup>a)</sup>	5.50	5.80	5.5	1.56	1.49	- 4.6
3 <sup>a)</sup>	10.00	10.01	0.1	1.51	1.52	0.9
4 <sup>a)</sup>	2.51	2.59	3.3	2.49	2.52	1.1
5 <sup>a)</sup>	5.01	5.11	1.9	2.49	2.49	- 0.2
6 <sup>a)</sup>	7.51	7.68	2.3	2.49	2.42	- 2.6
7 <sup>a)</sup>	7.51	7.24	-3.6	2.49	2.61	4.9
8 <sup>a)</sup>	7.50	7.41	-1.2	3.64	3.53	- 3.0
9 <sup>a)</sup>	2.51	2.49	-0.6	4.99	4.98	- 0.2
10 <sup>a)</sup>	2.51	2.48	-1.0	4.99	4.97	- 0.3
11 <sup>a)</sup>	5.01	4.92	-1.7	4.99	5.00	0.3
12 <sup>a)</sup>	7.51	7.26	-3.4	4.99	5.27	5.6
13 <sup>a)</sup>	10.00	9.93	-0.7	4.99	4.86	- 2.6
14 <sup>a)</sup>	1.50	1.45	-3.5	5.72	5.77	0.9
15 <sup>a)</sup>	2.51	2.47	-1.5	7.48	7.36	- 1.6
16 <sup>a)</sup>	2.51	2.70	7.6	7.48	7.42	- 0.7
17 <sup>a)</sup>	3.50	3.42	-2.3	7.80	7.80	-
18 <sup>a)</sup>	5.50	5.30	-3.6	7.80	7.84	0.5
19 <sup>a)</sup>	7.50	7.54	0.6	7.80	7.79	- 0.1
20 <sup>a)</sup>	1.50	1.38	-8.1	10.00	9.97	- 0.3
21 <sup>a)</sup>	5.01	5.60	11.7	9.97	9.94	- 0.3
22 <sup>a)</sup>	10.00	9.95	-0.5	9.97	10.04	0.7
23 <sup>b)</sup>	3.50	3.67	4.9	1.56	0.98	- 36.9
24 <sup>b)</sup>	7.50	7.90	5.3	1.56	0.98	- 37.2
25 <sup>b)</sup>	10.00	9.57	-4.3	2.49	1.95	- 21.5
26 <sup>b)</sup>	1.50	2.09	39.3	3.64	3.37	- 7.4
27 <sup>b)</sup>	3.50	3.69	5.4	3.64	3.78	3.7
28 <sup>b)</sup>	5.50	5.58	1.5	3.64	3.46	- 5.0
29 <sup>b)</sup>	3.50	2.63	-24.7	5.72	5.89	3.1
30 <sup>b)</sup>	5.50	5.89	7.1	5.72	5.78	1.1
31 <sup>b)</sup>	5.50	5.03	-8.6	5.72	6.15	7.6
32 <sup>b)</sup>	7.50	7.48	-0.2	5.72	5.69	- 0.5
33 <sup>b)</sup>	5.01	5.37	7.3	7.48	7.51	0.3
34 <sup>b)</sup>	7.51	7.84	4.4	7.48	7.86	5.1
35 <sup>b)</sup>	7.51	7.67	2.1	7.48	7.70	2.9
36 <sup>b)</sup>	7.51	7.30	-2.8	7.48	7.67	2.5
37 <sup>b)</sup>	10.00	9.45	-5.5	7.48	8.20	9.6
38 <sup>b)</sup>	1.50	1.61	7.2	7.80	7.70	- 1.3
39 <sup>b)</sup>	2.50	2.62	4.7	10.00	10.14	1.4
40 <sup>b)</sup>	2.50	2.34	-6.4	10.00	10.08	0.8
41 <sup>b)</sup>	7.51	7.77	3.4	9.97	9.72	- 2.5
			$RE_{cal} = 3.2$ $RE_{val} = 6.1$			$RE_{cal} = 1.4$ $RE_{val} = 5.1$

a) Muestras de calibración.

b) Muestras de validación.

c) Modelo PLS para la determinación de Atrazina. Datos centrados. 7 LVs. Variables: 202 - 400 nm cada 4 nm y 4 - 304 s cada 5 s.

d) Modelo PLS para la determinación de Bentazona. Datos autoescalados. 7 LVs. Variables: 202 - 400 nm cada 4 nm y 4 - 304 s cada 5 s.

**Anexo I-12:** Errores en la determinación de Atrazina y Alacloro en las muestras de calibración y validación cuando reaccionan con el FR en medio Metanol : Agua (60 % : 40%), en las condiciones óptimas establecidas en el punto “Uso Del Reactivo De Fenton Para Determinaciones Multicomponentes”

Muestra	[Atrazina] ( $10^5 \text{ mol l}^{-1}$ )		Error (%)	[Alacloro] ( $10^5 \text{ mol l}^{-1}$ )		Error (%)
	Puesto	Hallado <sup>c)</sup>		Puesto	Hallado <sup>d)</sup>	
1 <sup>a)</sup>	1.50	1.56	4.0	1.50	1.53	2.0
2 <sup>a)</sup>	4.50	4.67	3.8	1.50	1.46	-2.7
3 <sup>a)</sup>	7.50	7.40	-1.3	1.50	1.47	-2.0
4 <sup>a)</sup>	3.00	2.63	-12.3	3.00	3.00	-
5 <sup>a)</sup>	6.00	6.08	1.3	3.00	2.70	-10.0
6 <sup>a)</sup>	6.00	6.00	-	3.00	3.06	2.0
7 <sup>a)</sup>	1.50	1.52	1.3	4.50	4.38	-2.7
8 <sup>a)</sup>	4.50	4.68	4.0	4.50	4.50	-
9 <sup>a)</sup>	7.50	7.50	-	4.50	4.98	10.7
10 <sup>a)</sup>	3.00	2.94	-2.0	6.00	6.48	8.0
11 <sup>a)</sup>	6.00	5.97	-0.5	6.00	6.34	5.7
12 <sup>a)</sup>	1.50	1.35	-10.0	7.50	7.32	-2.4
13 <sup>a)</sup>	4.50	4.94	9.8	7.50	7.41	-1.2
14 <sup>a)</sup>	4.50	4.69	4.2	7.50	7.37	-1.7
15 <sup>a)</sup>	7.50	7.08	-5.6	7.50	7.01	-6.5
16 <sup>b)</sup>	3.00	2.90	-3.3	1.50	1.94	29.3
17 <sup>b)</sup>	1.50	1.31	-12.7	3.00	2.72	-9.3
18 <sup>b)</sup>	4.50	4.27	-5.1	3.00	3.18	6.0
19 <sup>b)</sup>	7.50	7.17	-4.4	3.00	3.23	7.7
20 <sup>b)</sup>	3.00	3.01	0.3	4.50	4.64	3.1
21 <sup>b)</sup>	6.00	5.86	-2.3	4.50	4.57	1.6
22 <sup>b)</sup>	1.50	1.57	4.7	6.00	6.07	1.2
23 <sup>b)</sup>	4.50	4.46	-0.9	6.00	6.20	3.3
24 <sup>b)</sup>	4.50	4.16	-7.6	6.00	6.32	5.3
25 <sup>b)</sup>	7.50	7.33	-2.3	6.00	6.05	0.8
26 <sup>b)</sup>	7.50	7.46	-0.5	6.00	6.41	6.8
27 <sup>b)</sup>	3.00	2.85	-5.0	7.50	7.67	2.3
28 <sup>b)</sup>	6.00	5.95	-0.8	7.50	7.18	-4.3
			RE <sub>cal</sub> = 4.1 RE <sub>val</sub> = 3.5			RE <sub>cal</sub> = 5.0 RE <sub>val</sub> = 4.8

<sup>a)</sup> Muestras de calibración.

<sup>b)</sup> Muestras de validación.

<sup>c)</sup> Modelo PLS para la determinación de Atrazina. Datos autoescalados. 3 LVs. Variables 202-400 nm cada 4nm; Tiempo: 4-304 s cada 5 s.

<sup>d)</sup> Modelo PLS para la determinación de Alacloro. Datos centrados. 3 LVs. Variables 202-400 nm cada 4nm; Tiempo 4-304 s cada 5 s.

