

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE QUÍMICA**



**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
LICENCIADO EN QUÍMICA**

**DESARROLLO DE UN MÉTODO ANALÍTICO BASADO EN
ANÁLISIS POR INYECCIÓN SECUENCIAL (SIA) CON
DETECCIÓN ESPECTOFOTOMÉTRICA PARA LA
DETERMINACIÓN DEL HERBICIDA PARAQUAT**

**PRESENTADO POR
CARLOS MARTÍN INFANTE CÓRDOVA**

LIMA-PERÚ

2003

GLOSARIO DE TÉRMINOS Y ABREVIATURAS

- **FIA** : Análisis por Inyección en Flujo (*Flow Injection Analysis*)
- **SIA** : Análisis por Inyección Secuencial(*Sequential Injection Analysis*)
- **PQ⁺⁺** : Ion Paraquat
- **Quats** : Familia de pesticidas Bipyridilos
- **SOD** : Superóxido dismutasa
- **NADPH** : Fosfato de dinucleótido de nicotinamida adenina
- **WHO** : Organización Mundial de la Salud (*World Health Organization*)
- **DL₅₀** : Dosis letal media
- **EPA** : Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de Norte América
- **ODWO** : *Ontario Drinking Water Objectives*
- **CONAMA** : Comisión Nacional de Medio Ambiente de Brasil
- **DIGESA** : Dirección General De Saneamiento Ambiental
- **INRENA** : Instituto de Recursos Naturales de Perú
- **SENASA** : Servicio Nacional de Saneamiento Ambiental
- **UAC** : Última aplicación antes de la cosecha en días
- **LMR** : Limite máximo de residuo en mg/L
- **HPLC** : Cromatografía líquida de alta eficiencia
- **CG** : Cromatografía a gas
- **EC** : Electroforesis capilar
- **CG-MS** : Cromatografía a gas acoplada a espectrometría de masas
- **AWWA** : *American Water and Waste-Water Association*
- **T_r** : Tiempo de residencia
- **D** : Coeficiente de dispersión del sistema
- **D⁰** : Señal del sistema lleno de solución colorante
- **D₁** : señal del sistema al inyectar el colorante en lugar de la muestra
- **Stopped-flow** : Método de parada de flujo.

ÍNDICE

	Pág.
GLOSARIO DE TÉRMINOS Y ABREVIATURAS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
ÍNDICE DE TABLAS	xi
RESUMEN	xii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ASPECTOS GENERALES SOBRE LA QUÍMICA DEL PARAQUAT	4
A. Paraquat	5
B. Propiedades químicas y físicas del Paraquat	8
C. Problemática ambiental, toxicológica del Paraquat	9
D. Límites máximos permisibles para el uso del Paraquat	14
III. MÉTODOS DE ANÁLISIS DEL PARAQUAT	17
A. Revisión de algunos métodos para el análisis del Paraquat	18
B. Método espectrofotométrico para la detección del Paraquat	20
IV. ANÁLISIS POR INYECCIÓN SECUENCIAL(SIA)	23
A. Antecedentes	24
B. Descripción de la técnica de análisis por inyección secuencial(SIA)	26
V. OBJETIVOS	32
VI. PARTE EXPERIMENTAL	34
A. MATERIAL Y METODOS	
1. Equipamientos Utilizados	35
2. Reactivos Utilizados	35

3. Procedimiento para la determinación espectrofotométrica con el sistema SIA.	36
4. Protocolo general para la determinación espectrofotométrica de Paraquat con el sistema SIA	37
B. Determinación de parámetros de operación del método SIA	39
1. Determinación de la longitud de onda de trabajo	39
a. Espectro UV/Visible del paraquat	39
b. Espectro UV/Visible del radical paraquat PQ ^{•+}	40
2. Optimización del volumen de muestra	42
3. Optimización de la longitud del camino analítico	44
4. Optimización del caudal de flujo	45
5. Influencia de la solución transportadora en la señal	46
6. Influencia del pH en la señal	48
7. Selección del ditionito de sodio como reductor del Paraquat	49
8. Estudio de la interpenetración de zonas	49
9. Influencia del "Stopped Flow" en la señal de detección	51
10. Estudio del coeficiente de dispersión	53
11. Curva de calibración	54
12. Estudio de la repetibilidad del método	61
13. Estudio de los límites de detección y determinación del método.	63
14. Número de análisis por hora (frecuencia analítica)	64
C. Resultados de las aplicaciones del sistema SIA en la determinación de Paraquat.	65
a. Formulaciones comerciales	65
b. Muestras de degradación por Hongos.	67

VII.	CONCLUSIONES	70
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
IX.	ANEXOS	76
	ANEXO 1: LIMITES MÁXIMOS DE RESIDUOS EN DIFERENTES PRODUCTOS COMERCIALES, FUENTE SENASA.	A-1
	ANEXO 2: REGISTRO EN SENASA DE HERBICIDAS QUE CONTIENEN PARAQUAT COMO INGREDIENTE ACTIVO.	A-4
	ANEXO 3: CÁLCULO DEL LÍMITE DE DETECCIÓN.	A-5

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Estructura del Paraquat.	5
Figura 2. Estructura de otros miembros de la familia de los Quats: A Diquat, B Chlormequat, C Difenzoquat, D Mepiquat.	5
Figura 3. Reacciones del Ditionito.	6
Figura 4. Reacción de reducción del Ion Paraquat, PQ^{2+} (catión con dos cargas positivas), al radical Paraquat, $PQ^{\cdot+}$ (con una carga positiva)	7
Figura 5. Reacción de reducción del $PQ^{\cdot+}$, radical Paraquat con una carga positiva, para formar el dihidrobipiridin, $PQ^{\cdot-}$, especie sin carga.	7
Figura 6. Formas resonantes del radical Paraquat, $PQ^{\cdot+}$	7
Figura 7. Preparación del Paraquat.	9
Figura 8. Reacciones de formación del superóxido $O_2^{\cdot-}$, en presencia de oxígeno se produce la regeneración del herbicida.	11
Figura 9. Mecanismo de toxicidad del Paraquat, Bus y colaboradores ⁽⁶⁾ .	11
Figura 10. Esquema básico de un espectrofotómetro.	21
Figura 11. Celda espectrofotométrica para análisis en flujo, <i>IN</i> indica entrada de líquido, <i>OUT</i> indica salida de líquido.	22
Figura 12. Operaciones analíticas manuales y automatizadas, a) análisis manual, b) analizador discreto, c) analizador de flujo continuo segmentado.	24
Figura 13. Configuración del sistema de Análisis por Inyección Secuencial (SIA)	27
Figura 14. Ejemplo de registro típico de la señal analítica obtenida en condiciones optimizadas. Longitud de onda = 605nm, $Na_2S_2O_4$ 0.1%(m/v), Solución transportadora: Tampón Borato 0,05M pH=9, Caudal de flujo 75 μ L/seg, Camino analítico 50 cm., Volumen de muestra 300 μ L, a 2 mg/L, b 4 mg/L c 8 mg/L. Instrumento, espectrofotómetro Micronal B382.	28

- Figura 15. Desarrollo de la señal analítica en función del tiempo, A tiempo en el cual se realiza la medición, B tiempo en el cual se realiza otra medición, cualquiera de ellos puede utilizarse, para construir una curva de calibración y el respectivo análisis de varias muestras. 29
- Figura 16. Dispersión del sistema, C^{\max} indica el momento en que el producto de reacción atraviesa el detector. 30
- Figura 17. Espectro de absorción del Paraquat en solución de tampón borato pH = 9, 0.05M, concentración del Paraquat 5×10^{-5} M. 39
- Figura 18. Espectro de absorción del Paraquat reducido con ditionito de sodio, concentración del Paraquat 5×10^{-5} M, 0.1% (m/v), tampón borato pH = 9, 0.05M. 40
- Figura 19. Espectros de absorción del Paraquat y Diquat reducidos por ditionito de sodio, concentración de ambos 5×10^{-5} M en solución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 0.1%(m/v), tampón borato pH = 9, 0.05M 41
- Figura 20. Influencia del volumen de muestra en la señal. Condiciones utilizadas: Longitud de onda = 605nm, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 0.05%(m/v), Solución transportadora: tampón Borato pH=9, 0.05M, Concentración del estándar de Paraquat 3mg/L, Caudal de flujo 75 μ L/s, longitud del reactor 50 cm, Instrumento espectrofotómetro Micronal B382. 43
- Figura 21. Influencia de la longitud del camino analítico sobre la señal, condiciones utilizadas: Longitud de onda = 605nm, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 0.01%(m/v), Solución transportadora: Tampón Borato pH=9, 0.05M, Concentración del Paraquat 3 mg/L, Volumen de muestra 300 μ L, caudal 75 μ L/seg. Instrumento, espectrofotómetro Micronal B382. 44
- Figura 22. Influencia del caudal de flujo en la señal, condiciones utilizadas: Longitud de onda = 605nm, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 0.1% (m/v), Solución transportadora: Tampón Borato 0,05M pH=9, Concentración del estándar de Paraquat 3 mg/L, Volumen de muestra 300 μ L, camino analítico 50cm, instrumento espectrofotómetro Micronal B382. 45

- Figura 23. Influencia en la señal analítica, de la diferencia entre la composición de la solución transportadora y el medio en que la muestra es disuelta, para un estándar de 3mgL^{-1} de Paraquat, condiciones: Longitud de onda = 605nm , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ $0.1\%(m/v)$, Solución transportadora: Tampón Borato $0,05\text{M}$ $\text{pH}=9$, Caudal de flujo $75\mu\text{L}/\text{seg}$, Camino analítico 50 cm. , Volumen de muestra $300\mu\text{L}$. Instrumento espectrofotómetro Micronal B382. 47
- Figura 24. Influencia del pH en la señal de detección, para un estándar e 3mgL^{-1} de Paraquat en solución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ $0.1\%(m/v)$, Condiciones: Longitud de onda = 605nm , Volumen de muestra $300\mu\text{L}$, Camino analítico 50 cm , Solución transportadora, tampón Borato $\text{pH}=\text{Variable}$ $0,05\text{M}$, Instrumento espectrofotómetro Micronal B382. 48
- Figura 25. Zonas de reacción antes del envío al detector, (0) Paraquat, (I) Ditionito de sodio, (II) Solución transportadora. 49
- Figura 26. Influencia del volumen de reactivo en la señal analítica; En las graficas presentadas, cada pico es obtenido colocando el colorante azul de bromotimol en la concentración de 4mg L^{-1} en una puerta de la válvula y tampón borato 0.01M (que también actúa como solución transportadora) en las otras. Entre cada gráfico se varia el "volumen de reactivo", en el rango de $25\mu\text{L}$ a $300\mu\text{L}$, con el volumen de "muestra" fijo en $300\mu\text{L}$, Camino analítico 50 cm , caudal de flujo $75\mu\text{L}/\text{s}$. Longitud de onda de trabajo 620nm , Instrumento, espectrofotómetro Micronal B382. 50
- Figura 27. Influencia del stopped-flow en la señal, condiciones utilizadas: Longitud de onda $\lambda = 605\text{nm}$, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ $0.1\%(m/v)$, Solución transportadora: Tampón Borato $0,05\text{M}$ $\text{pH}=9$, Concentración del estándar de prueba: $3\mu\text{g}/\text{mL}$, Volumen de muestra $300\mu\text{L}$, Camino analítico 50 cm , caudal $75\mu\text{L}/\text{seg}$. Tiempo de parada 120s . Instrumento espectrofotómetro Micronal B382. 52

- Figura 28. Estudio del coeficiente de dispersión, Colorante Azul de bromotimol 4mgL^{-1} , Longitud de onda = 600nm , Solución Transportadora.: Tampón Borato $0,01\text{M}$ $\text{pH}=9$, Volumen de "muestra" $300\mu\text{L}$, caudal de flujo $75\mu\text{L}/\text{seg}$. D° = Colorante en todo el Sistema, D_1 = reemplazando solo la muestra por el colorante, espectrofotómetro Micronal B382. 53
- Figura 29. Siagrama en condiciones optimizadas, Longitud de onda= 605nm , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ $0.1\%(m/v)$, Solución transportadora: Tampón Borato $0,05\text{M}$ $\text{pH}=9$, Volumen de muestra $300\mu\text{L}$, Caudal de flujo $75\mu\text{L}/\text{seg}$. Camino analítico 50 cm , rango de trabajo de 0.1 mg/L a 20 mg/L de Paraquat. Instrumento Espectrofotómetro Micronal B382. 54
- Figura 30. Ampliación de uno de los picos del Siagrama para varias concentraciones, Condiciones: Longitud de onda = 605nm , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ $0.1\%(m/v)$, Solución transportadora: Tampón Borato $0,05\text{M}$ $\text{pH}=9$, Volumen de $300\mu\text{L}$, caudal de flujo $75\mu\text{L}/\text{seg}$. Camino analítico 50 cm ; Concentraciones de Paraquat: a 20 mg/L , b 18 mg/L , c 15 mg/L , d 12 mg/L , e 10 mg/L , f 8 mg/L , g 5 mg/L , h 4 mg/L , i 3 mg/L , j 2 mg/L , k 1 mg/L , l 0.8 mg/L , las concentraciones 0.5 , 0.4 , 0.2 mg/L , pueden ser observadas en una ampliación. 55
- Figura 31. Curva de calibración en condiciones optimizadas, Longitud de onda = 605nm , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 0.1% , Solución transportadora: Tampón Borato $0,05\text{M}$ $\text{pH}=9$, Volumen de $300\mu\text{L}$, Caudal de flujo $75\mu\text{L}/\text{seg}$. Camino analítico 50 cm , rango de trabajo de 0.1 mg/L a 20 mg/L de Paraquat. Instrumento Espectrofotómetro Micronal B382. 57
- Figura 32. Curva de calibración en condiciones optimizadas, Longitud de onda = 605nm , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ $0.1\%(m/v)$, Solución transportadora: Tampón Borato $0,05\text{M}$ $\text{pH}=9$, Volumen de $300\mu\text{L}$, Caudal de flujo $75\mu\text{L}/\text{seg}$. Camino analítico 50 cm ; a 0.1 mg/L , b 0.2 mg/L , c 0.4 mg/L , d 0.8 mg/L , e 0.1 mg/L , f 1.6 mg/L , de Paraquat. Instrumento Espectrofotómetro Micronal B382. 58

- Figura 33. Curva de calibración en condiciones optimizadas, Longitud de onda = 605nm, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 0.1%(m/v), Solución transportadora: Tampón Borato 0,05M pH=9, Volumen de muestra 300 μL , Caudal de flujo 75 $\mu\text{L}/\text{seg}$. Camino analítico 50 cm, rango de trabajo de 0.1 mg/L a 1.6 mg/L, de Paraquat. Instrumento Espectrofotómetro Micronal B382. 59
- Figura 34. Curva de calibración en condiciones optimizadas, Longitud de onda = 605nm, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 0.1%(m/v), Solución transportadora: Tampón Borato 0,05M pH=9, Volumen de 300 μL , caudal de flujo 75 $\mu\text{L}/\text{seg}$. Camino analítico 50 cm, rango de trabajo de 1 mg/L a 6 mg/L, de Paraquat. Instrumento Espectrofotómetro Micronal B382. 60
- Figura 35. Curva de calibración en condiciones optimizadas, Longitud de onda = 605nm, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 0.1%(m/v), Solución transportadora: Tampón Borato 0,05M pH=9, Volumen de muestra 300 μL , caudal de flujo 75 $\mu\text{L}/\text{seg}$. Camino analítico 50 cm, rango de trabajo de 1 mg/L a 6 mg/L de Paraquat. Instrumento Espectrofotómetro Micronal B382. 61
- Figura 36. Estudio de la Repetibilidad del método, Longitud de onda = 605nm, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 0.1%(m/v), Solución transportadora: Tampón Borato 0,05M pH=9, Volumen de muestra 300 μL , caudal de flujo 75 $\mu\text{L}/\text{seg}$. Camino analítico 50cm, Estándar de 5.0 mg/L de Paraquat. Instrumento Espectrofotómetro Micronal B382. 62
- Figura 37. Estudio del limite de detección del método, registro de 11 repeticiones del análisis, Longitud de onda = 605nm, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, 0.1%(m/v), Solución transportadora: Tampón Borato 0,05M pH=9, Volumen de muestra 300 μL , Caudal de flujo 75 $\mu\text{L}/\text{seg}$. Camino analítico 50 cm. Instrumento Espectrofotómetro Micronal B382. 63
- Figura 38. Siagrama del análisis de la formulación comercial Gramoxone, 9 análisis: Longitud de onda = 605nm, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 0.1%(m/v), Solución transportadora: Tampón Borato 0,05M pH=9, Volumen de muestra 300 μL , Caudal de flujo 75 $\mu\text{L}/\text{seg}$. Camino analítico 50 cm. Instrumento Espectrofotómetro Micronal B382. 65

Figura 39. Resultados obtenidos en el caso del Paraquat, concentración en mg/L, en la forma de $C_{12}H_{14}N_2Cl_2$ en condiciones, Longitud de onda = 605nm, $Na_2S_2O_4$ 0.1%(m/v), Solución transportadora: Tampón Borato 0,05M pH=9, Volumen de muestra 300 μ L, caudal de flujo 75 μ L/seg. Camino analítico 50cm. Concentración en mg/L de Paraquat. "Fungo" representa el tipo de hongo utilizado, y "Gli" el tipo de medio, ambas informaciones se mantienen en reserva. Instrumento, espectrofotómetro Micronal B382

68

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Propiedades físicas del Paraquat.	8
Tabla 2. Clasificación de la Organización Mundial de la Salud para plaguicidas.	13
Tabla 3. Información sobre los usos del Paraquat	15
Tabla 4. Algunos productos comerciales registrados en Perú ante SENASA, que contienen Paraquat.	15
Tabla 5. Datos obtenidos para la curva de calibración de Paraquat, en absorbancia (altura de pico), a tiempos diferentes, T1, T2, T3.	56
Tabla 6. Datos obtenidos para la curva de calibración en el rango de 0.1 a 1.6 mg/L, de Paraquat en condiciones optimizadas.	58
Tabla 7. Datos obtenidos para la curva de calibración en el rango de 1 a 6 mg/L de Paraquat.	62
Tabla 8. Datos obtenidos en el análisis de Paraquat en la Formulación comercial Gramoxone, condiciones: Longitud de onda = 605nm, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 0.1%(m/v), Solución transportadora: Tampón Borato 0,05M pH=9, Volumen de 300 μL , caudal de flujo 75 $\mu\text{L}/\text{seg}$. Camino analítico 50cm. Instrumento, espectrofotómetro Micronal B382.	66
Tabla 9. Datos obtenidos para las muestras analizadas.	68

RESUMEN

En el presente trabajo se explora la aplicación del análisis por inyección secuencial (SIA), en la determinación espectrofotométrica del herbicida Paraquat, utilizando como reactivo ditionito de sodio.

Espectros de absorción molecular del herbicida Paraquat, en la presencia y ausencia de ditionito de sodio, muestran un comportamiento deseable para el desarrollo de un método analítico en flujo, rápido desarrollo del color y fuerte absorción, en una longitud de onda bastante libre de interferentes típicos.

Se inicia el desarrollo del método, evaluando la posible perturbación en la señal analítica debido a diferencias entre la composición de la muestra y la solución transportadora, así como el pH de la solución transportadora, decidiendo el uso de tampón borato 0.05M a pH=9.

Enseguida se estudiaron las variables clásicas de SIA: volumen de muestra, razón de flujo hacia el detector y longitud de camino analítico determinando los mejores valores para ellas.

A continuación se escoge la concentración de ditionito de sodio que proporciona la mayor señal analítica, y se realizan estudios de "Stopped Flow", parada de flujo, para establecer si el tiempo de residencia es adecuado y se estudia la dispersión del sistema.

Una vez establecidas las mejores condiciones, se prepara el protocolo de análisis, se preparan las curvas de calibración, se escoge el rango lineal de trabajo, se estudia la repetibilidad del método y se determina el límite de detección.

Con el método operando en las mejores condiciones se analizan muestras de agrotóxicos comerciales, y se colabora realizando los análisis de Paraquat en un medio de cultivo de hongos cuya finalidad es la destrucción del herbicida.

Las aplicaciones del método SIA desarrollado resultaron satisfactorias, caracterizándose por; Operación simple, costo moderado, generación mínima de residuos, y buena frecuencia de análisis por hora. Se deja abierta la posibilidad para explorar nuevas aplicaciones en diversos estudios.

I. INTRODUCCION

“El análisis por inyección de flujo no puede ser explicado. Debe ser demostrado”

B. Kalberg and G.E. Pacey

I. INTRODUCCION.

El aumento de la población mundial generó en las últimas décadas, una búsqueda incesante por aumentar la productividad de las tierras de cultivo, lo que intensificó el uso de agrotóxicos con la finalidad de disminuir las pérdidas por ataques de diferentes plagas. Debido al uso intensivo a escala mundial del herbicida Paraquat en diferentes cultivos y a su potencial toxicidad resulta importante contar con un método analítico de costo moderado, de operación simple, con alta frecuencia de análisis (comparado con la espectrofotometría clásica), mecanizado o automatizado, y con amplia posibilidad de acoplamiento en diversos procesos, para la determinación de las concentraciones del herbicida en diferentes tipos de muestras como; Formulaciones comerciales de agrotóxicos, muestras ambientales (aguas, suelos, etc.) y muestras biológicas (sangre y orina etc.)

Las técnicas instrumentales típicamente utilizadas como cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), cromatografía a gas (CG), electroforesis capilar (EC), etc., requieren gran inversión para el inicio de las operaciones, y tienen alto costo de operación y mantenimiento. Las metodologías analíticas en flujo resultan una buena alternativa pues su costo es menor en todos los casos mencionados anteriormente. El análisis por inyección en flujo (FIA), la primera opción, fue aplicado con éxito en el análisis de diversos pesticidas, incluyendo el Paraquat, pero el análisis por inyección secuencial (SIA), sin múltiples líneas de flujo que exigen re-calibraciones frecuentes, permite realizar, en forma mecanizada o automatizada, determinaciones de Paraquat en un amplio rango de concentraciones y matrices. Esta técnica permite además mayor versatilidad para adaptar varias metodologías analíticas, incluyendo métodos de separación

y preconcentración, a un costo moderado y con una ventaja fundamental: la gran economía de muestra y de reactivos con generación mínima de residuos.

En el presente trabajo se expone el desarrollo de un método analítico mecanizado basado en análisis por inyección secuencial (SIA), con detección espectrofotométrica, para la determinación del Paraquat, presentando el análisis del herbicida en muestras de formulaciones comerciales y un trabajo en colaboración con la Facultad de Salud Pública de São Paulo-Brasil. Se deja abierta la posibilidad de seguir explorando el método de análisis por inyección secuencial (SIA) y las diversas metodologías en flujo para nuevas aplicaciones.

II ASPECTOS GENERALES SOBRE LA QUÍMICA DEL PARAQUAT

“El análisis por inyección de flujo es una herramienta para desempeño químico”

B. Kalberg and G.E. Pacey

II. ASPECTOS GENERALES SOBRE LA QUÍMICA DEL PARAQUAT.

A. El Paraquat

El Paraquat (PQ), terminología aplicada a los compuestos⁽¹⁾, *dicloruro de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridilium* ($C_{12}H_{14}N_2Cl_2$) y *dimetilsulfato de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridilium* ($C_{12}H_{14}N_2[CH_3SO_4]_2$), también conocido como Metil Viologen, está constituido por dos anillos piridínicos unidos de tal manera que los átomos de nitrógeno se encuentran diametralmente opuestos, es decir en posición para, cada uno de ellos tiene unido un grupo metilo. La estructura del herbicida se muestra a continuación (Fig. 1)

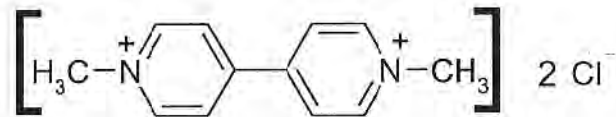


Figura 1. Estructura del Paraquat

Este herbicida es el más importante miembro de la familia de pesticidas conocida como los "Quats", cuyo segundo integrante en importancia es el Diquat, siendo otros miembros el Chlormequat, Difenzoquat y el Mepiquat, cuyas estructuras se muestran a continuación (Fig. 2)

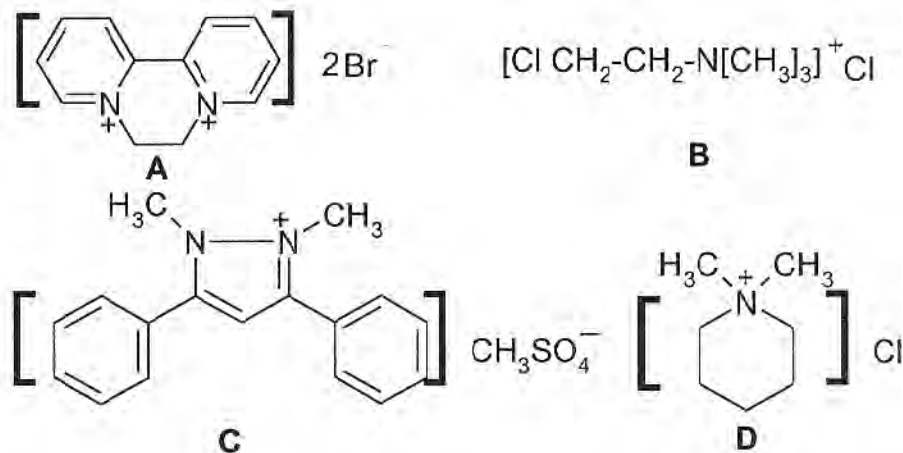


Figura 2. Estructura de otros miembros de la familia de los Quats: A Diquat, B Chlormequat, C Difenzoquat, D Mepiquat

La química del Paraquat es dominada por su habilidad para tomar un electrón, este puede ser transferido parcialmente, a partir de un nucleófilo u otro compuesto rico en electrones, o completamente a partir de un agente reductor, en el primer caso se forman complejos coloreados de transferencia de carga, y en el segundo caso tenemos la formación de cationes radicales de Paraquat de color azul. Este radical es fundamental para la determinación del Paraquat en el presente trabajo.

La reducción del Paraquat al producto coloreado azul por una solución alcalina de ditionito de sodio fue reportada por Michaelis en 1932⁽²⁾. El potencial asociado con esta reducción es $-0.44V$ (relativo al potencial normal de hidrogeno), siendo que esta reacción es reversible y el producto es estable en la ausencia de aire pues se trata de un radical libre. Según Mahoney y colaboradores⁽³⁾ el ditionito de sodio en solución alcalina actúa como agente reductor a un potencial de $-1.13V$ y presenta un equilibrio con el radical $SO_2^{\cdot-}$ el cual genera un electrón y SO_2 que reacciona con el agua formando el bisulfito según se muestra en la figura siguiente (Fig. 3)

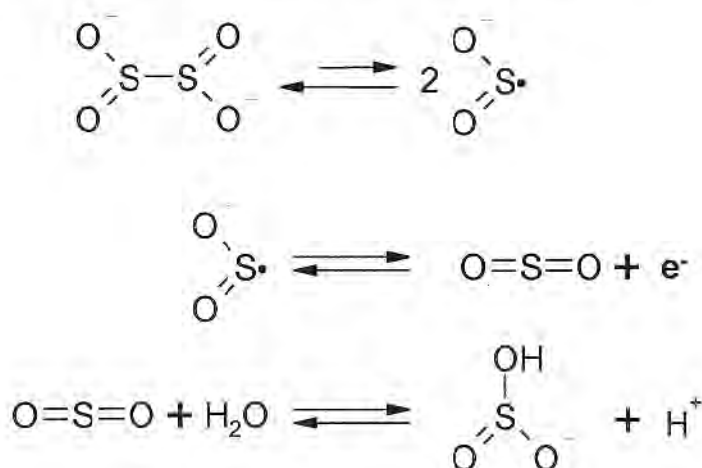


Figura 3. Reacciones del Ditionito

El electrón generado en la segunda etapa del proceso anterior, reducirá al catión Paraquat formando un radical de Paraquat con una carga positiva⁽¹⁾, a continuación se muestran la reacción aceptada para este proceso (Fig. 4)

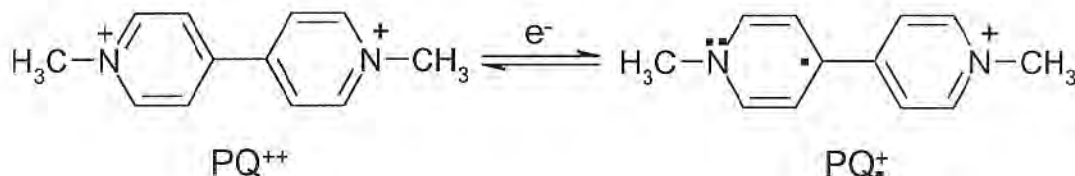


Figura 4. Reacción de reducción del ion Paraquat, PQ^{++} (catión con dos cargas positivas), al radical Paraquat, $\text{PQ}^{\bullet+}$ (con una carga positiva)

Como un proceso natural este radical será reducido a dihidropiridin con un potencial redox de -0.79V , según puede apreciarse en la figura 5.

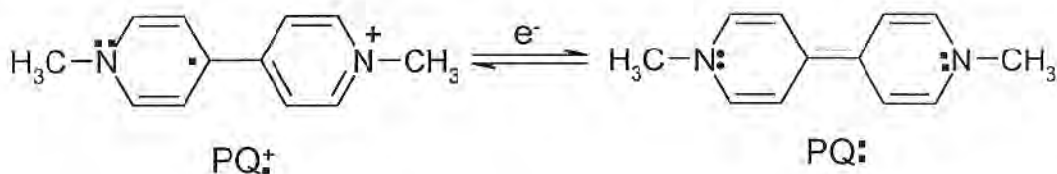


Figura 5. Reacción de reducción del $\text{PQ}^{\bullet+}$, radical Paraquat con una carga positiva, para formar el dihidropiridin, $\text{PQ}:$, especie sin carga.

El radical de Paraquat presentado en la figura anterior es una de las 12 posibles formas resonantes en las cuales el electrón puede ocupar diferentes posiciones, a continuación se presentan algunas de ellas (Fig. 6)

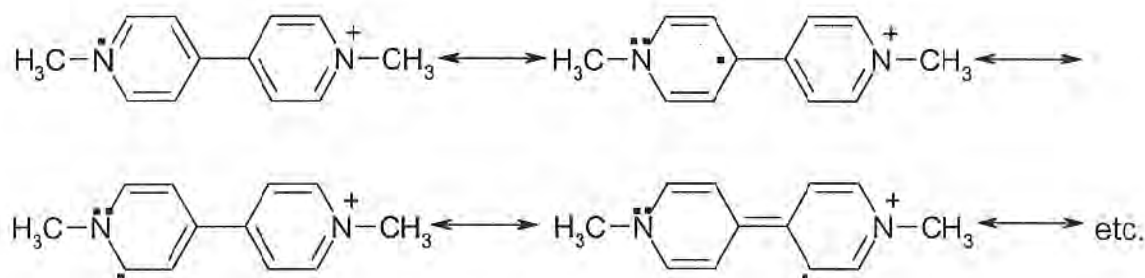


Figura 6. Formas resonantes del radical Paraquat, $\text{PQ}^{\bullet+}$

De acuerdo con estas estructuras resonantes la estabilidad del radical Paraquat puede ser racionalizada por la des-localización de los electrones en los anillos de la molécula.

B. Propiedades químicas y físicas del Paraquat

En la forma pura es un sólido cristalino brillante, incoloro, inodoro e higroscópico⁽⁴⁾. En la forma técnica es un líquido de color rojizo-marrón. El Paraquat como una sal de amonio cuaternaria tiene elevada polaridad, siendo altamente, soluble en agua, ligeramente soluble en metanol, y prácticamente insoluble en solventes orgánicos.

Este herbicida no es explosivo o inflamable en formulaciones acuosas, es estable en medio ácido o neutro, pero puede ser rápidamente hidrolizado por soluciones fuertemente alcalinas. Es comúnmente utilizado como herbicida, no selectivo de acción rápida, y en algunos casos como desecante. Algunas de las más importantes propiedades físicas del Paraquat son presentadas a continuación en la Tabla 1.

Propiedades Físicas	
Densidad (g /L)(20 °C)	1.240 – 1.260
Punto de Fusión (°C)	~300 con descomposición
Solubilidad en agua (g /L)(20 °C)	700
pH de formulaciones líquidas(Agua)	6.5 – 7.5
Volatilidad	No volátil
Presión de vapor	No determinada

Tabla 1. Propiedades físicas del Paraquat.

El Paraquat puede prepararse a partir del 4,4-bipiridin reaccionando con cloruro de metilo⁽⁵⁾, como se muestra en la figura 7.

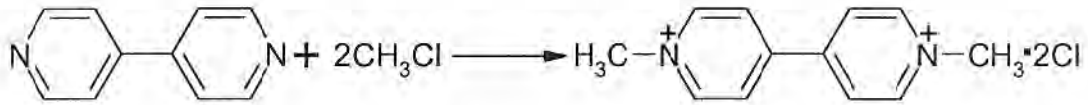


Figura 7. Preparación del Paraquat

C. Problemática ambiental, toxicología del Paraquat

El herbicida Paraquat es extremadamente tóxico para el hombre, conociéndose casos de envenenamiento accidental, asesinatos y suicidios.

Debido a que el Paraquat es utilizado directamente sobre las plantas para preservarlas, algunos residuos activos pueden permanecer en ellas, así como en las tierras de cultivo, que tienden a soportar grandes concentraciones del herbicida. El Paraquat acumulado en las tierras de cultivo es arrastrado por las precipitaciones permitiendo su ingreso en los efluentes con el consiguiente deterioro ambiental. No es de extrañar también que la poca experiencia en la manipulación y control en su uso provoque exposición peligrosa de trabajadores, que puede desencadenar en intoxicaciones agudas.

La exposición ocupacional al Paraquat puede ocurrir principalmente en las industrias de formulaciones y en las áreas de aplicación agrícola⁽¹⁾.

Las vías más probables de acceso por las cuales ingresaría el Paraquat son; la cutánea y la respiratoria, especialmente debido a que el producto debe ser diluido para su aplicación, momento en el cual el producto concentrado puede entrar en contacto con la piel causando irritación o lesiones cutáneas y aumentando la posibilidad de absorción dérmica del compuesto. Debido a su

baja presión de vapor el Paraquat será difícilmente inhalado, sin embargo en el momento de la aplicación, pequeñas gotas son producidas por los equipos de aspersión con lo cual se convierten en una posibilidad para el ingreso del herbicida por las vías respiratorias, aun cuando la irritación de la mucosa disminuye la posibilidad de absorción en gran escala. En 1976 organismos americanos de salud pública alertaron de altas concentraciones de Paraquat en marihuana, Cannabis, procedente de Méjico, resultando un caso curioso la intoxicación entre los consumidores de marihuana, aún en algunos casos severa, a pesar de que solo el 0.03% está presente en el humo y sólo un 1% permanece en las cenizas.

La exposición puede darse también a través de la cadena alimenticia debido al uso incorrecto del herbicida que contamina los alimentos para consumo animal o humanos.

Sin duda la ingestión accidental o intencional de Paraquat resulta ser el mayor responsable por los casos de intoxicaciones agudas por este compuesto.

En las intoxicaciones por Paraquat, independientemente de la vía de acceso, los pulmones son los órganos que presentan las más serias alteraciones. El mecanismo exacto para la toxicidad del Paraquat todavía no se encuentra totalmente elucidado, sin embargo los principales mecanismos presentados en la literatura sugieren que la generación de radicales libres tiene un importante papel. Bus y colaboradores⁽⁶⁾ refieren que la generación del radical superóxido, como consecuencia de la reacción entre el Paraquat y el oxígeno (Fig. 8) induce la lipoperoxidación.

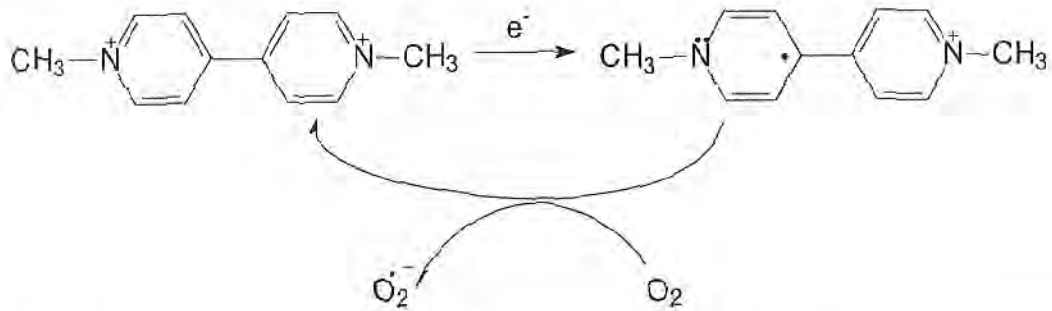


Figura 8. Reacciones de formación del superóxido $O_2^{\bullet-}$, en presencia de oxígeno se produce la regeneración del herbicida.

Se ha mencionado el rol de este radical como modificador de los niveles de superóxido dismutasa (SOD) a escala intracelular.

Se sugiere también la hipótesis que otros radicales libres derivados del oxígeno pueden estar envueltos en el proceso y que la disminución de NADPH (Fosfato de dinucleótido de nicotinamida adenina) en los pulmones con formación de sulfuros sería una posible ruta del mecanismo de toxicidad. En la figura 9 se presenta un esquema resumido de la propuesta de Bus y colaboradores⁽⁶⁾, la más importante de las mencionadas.

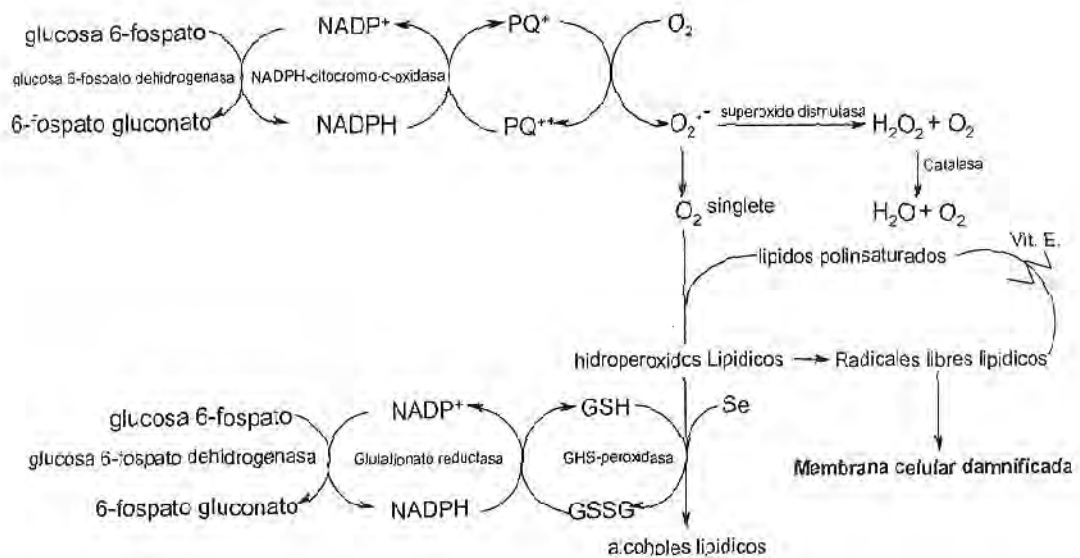


Figura 9. Mecanismo de toxicidad del Paraquat, Bus y colaboradores⁽⁶⁾.

Uno de los aspectos más dramáticos de las intoxicaciones con Paraquat es que no se conoce hasta hoy ningún antídoto capaz de contrarrestar sus efectos, los tratamientos existentes consisten esencialmente en la tentativa de retirar el compuesto del organismo.

Entre los tratamientos mencionados en la literatura⁽¹⁾ destacan para la prevención la vitamina C, por su efecto antioxidante, Selenio, por ser un cofactor del glutionato peroxidasa, protege contra intoxicaciones agudas de Paraquat, el Zinc inhibe la producción de radicales libres disminuyendo los efectos tóxicos de Paraquat, todos estos tratamientos preventivos sin embargo no cuentan con la adecuada evidencia clínica que respalde su posible utilización y sólo se tienen indicios de su eficiencia. En casos de intoxicación se recomienda la siguiente metodología de tratamiento: Antes de cumplidas 4 horas desde la ingestión de Paraquat se debe tratar de evitar la absorción del compuesto a través de un lavado gástrico cuidadoso, transcurridas más de 4 horas y cuando se sospecha de la absorción significativa del herbicida debe verificarse los niveles del herbicida a través de los análisis en sangre u orina para proceder a intentar removerlo del sistema circulatorio por diuresis forzada con dextrosa salina e incluso hemodiálisis.

La Organización Mundial de la Salud recomienda, desde 1975, una clasificación para plaguicidas que ha venido generando amplia aceptación en el ámbito mundial y que ha permitido uniformizar terminologías y formas de clasificación WHO (World Health Organization, 1988)

La clasificación se basa en el riesgo agudo a la salud que corre una persona que manipule el producto de acuerdo a las instrucciones del fabricante o en concordancia con las reglas establecidas para el almacenamiento y

transporte de mismo, los parámetros utilizados son la toxicidad aguda, tanto oral como dérmica, medida en ratas y expresada en dosis letal media (DL₅₀), siendo el plaguicida clasificado no solo en función del ingrediente activo, si no también por sus formulaciones, por lo que en realidad cada producto comercial (formulación) tiene su propia ubicación en la clasificación.

Las clases son identificadas de la forma siguiente:

Ia = Extremadamente Riesgoso

Ib = Altamente Riesgoso

II = Moderadamente Riesgoso

III = Ligeramente Riesgoso

En la tabla 2 se expresa la clasificación de la Organización Mundial de la Salud

CLASE	DOSIS (mg /K)			
	ORAL		DÉRMICA	
	SÓLIDO	LIQUIDO	SÓLIDO	LIQUIDO
Ia	5 menos	20 o menos	10 o menos	40 o menos
Ib	5 - 50	20 - 20	10 - 100	40 - 400
II	50 - 500	200 - 2 000	100 - 1.000	400 - 4 000
III	> 500	> 2 000	> 1 000	> 4 000

Tabla 2. Clasificación de la Organización Mundial de la Salud para plaguicidas.

Basados en esta clasificación y en estudios de toxicología realizados por Kimbrough y colaboradores⁽⁷⁾ el Paraquat estaría ubicado en la clasificación II, moderadamente riesgoso, para la dosis oral y Ib, Altamente riesgoso en el caso de exposición dérmica.

D. Límites máximos permisibles para el uso del Paraquat

La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de Norte América (EPA) establece un límite de tolerancia en aguas de abastecimiento público de $3 \mu\text{g L}^{-1}$ en el caso del Paraquat.

La comunidad europea establece un límite de $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ para cada pesticida.

ODWO (Ontario Drinking Water Objectives) establece un límite máximo de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ en el caso del Paraquat.

En Brasil la CONAMA (Comisión Nacional de Medio Ambiente de Brasil) establece límites máximos de residuos de pesticidas en aguas dependiendo de su destino final, sin embargo el herbicida Paraquat y muchos otros herbicidas no están contemplados.

La legislación Peruana no establece límites máximos de residuos de pesticidas en aguas dependiendo de su destino final, pero una comisión de alto nivel se ha formado con la participación del Ministerio de Salud, a través de DIGESA (Dirección General De Saneamiento Ambiental), e INRENA (Instituto Nacional de Recursos Naturales) con el fin de establecer una nueva clasificación de aguas y generar reglamentos que contemplen a la mayoría de los herbicidas actualmente utilizados, en este sentido el Paraquat estaría incluido en esa nueva legislación.

El herbicida Paraquat tiene una relación de usos recomendada por SENASA⁽⁸⁾ (Servicio Nacional de Saneamiento Ambiental), así como también se tiene establecidos límites máximos de residuos en diferentes productos

comestibles, a continuación se muestra (Tabla 3) un extracto de la tabla general proporcionada por SENASA (anexo1)

Nombre Comercial	Categoría Toxicológica	Cultivo (Nombre Común)	Cultivo (Nombre Técnico)	Plaga (Nombre Común)	Plaga (Nombre Técnico)	DOSIS L / HA	UAC (DIAS)	LMR (mg/L)
HERBITOX	ALTAMENTE PELIGROSO	Palma aceitera	Elaeis guineensis	Gramma china	Sorghum halepense	1-3	21	0.5
AGROXONE SUPER	ALTAMENTE PELIGROSO	Palma aceitera	Elaeis guineensis	Nudillo comun	Brachyaria mutica	1-3	2	0.05
AGROXONE SUPER	ALTAMENTE PELIGROSO	Plátano	Musa paradisiaca	Pajilla	Chloris sp.	1-3	2	0.05

Tabla 3. Información sobre los usos del Paraquat

Como puede observarse para el producto con nombre común Paraquat se muestran, el nombre comercial, la categoría toxicológica, el cultivo (nombre común y nombre técnico), la plaga en la cual se aplica (nombre común y nombre técnico), la dosis (en Litros aplicables por hectárea), la última aplicación antes de la cosecha (UAC) en días, y el límite máximo de residuo (LMR) en mg/L. En cuanto a la comercialización, este herbicida puede ser obtenido en diversas formulaciones, tanto aisladamente como en mezclas con otros compuestos⁽⁹⁾, en el Perú son comercializadas diversas marcas comerciales registradas en SENASA⁽⁸⁾, a continuación (Tabla 4) se presenta un extracto de la tabla con información actualizada que consta en el anexo 2.

Nombre Común	Nombre Comercial	Origen	Empresa Titular Del Registro
PARAQUAT	GRAMOXONE SUPER	Brasil/Gran Bretaña	Syngenta Crop Protection S.A. Suc. Peru
PARAQUAT	FOLQUE	Brasil/Colombia/Gran Bretaña	Basf Peruana S.A.
PARAQUAT	HERBITOX	Nacional/Taiwan	Indagro-Ronel Hidalgo Huertas
PARAQUAT	AGROXONE SUPER	Israel/Taiwan	Importaciones Ronald S.A.
PARAQUAT	WESTQUAT	Guatemala	Westrade Peru S.A.
PARAQUAT	ZAFA 240 LC	Nacional	Tecnología Química Y Comercio S.A.

Tabla 4. Algunos productos comerciales registrados en Perú ante SENASA, que contienen Paraquat.

Según estimaciones en el ámbito nacional⁽⁷⁾, en 1997, en el Perú se consumieron cerca de 50 millones de dólares US en plaguicidas. De este gran total, más de la mitad fue en insecticidas y alrededor del 18% en herbicidas. Los cultivos más tratados con plaguicidas son: hortalizas (24%), papa (17%), frutales (15%) y algodón (11%).

En el país hay más de 50 herbicidas y mezclas registradas ante SENASA. Los herbicidas de mayor uso son: Glifosato, Paraquat, Asulam, Molinate, Butachlor, Ametrina, Atrazina, Terbutilazina, 2,4 D, Oxadiazon, Propanil, Picloram y Linuron, los cuales pueden adquirirse en muchos establecimientos comerciales sin mayor control .

El uso principal de los herbicidas se encuentra en los cultivos de caña de azúcar, de arroz entre otros. El Paraquat y el Glifosato son los herbicidas más usados en el caso de cultivos café y frutales.

En el año 2002 el panorama cambió mucho, en cuanto a la comercialización y consumo de Agrotóxicos. Tratando el caso de herbicidas, las importaciones únicamente de Paraquat sumaron alrededor de 160 toneladas totalizando cerca de 500 mil dólares USA, la mayor parte procedente de Israel y Brasil⁽⁸⁾

III MÉTODOS DE ANÁLISIS DEL PARAQUAT

“Si algo puede resultar mal, entonces resultará mal”

Murphy

III. MÉTODOS DE ANÁLISIS DEL PARAQUAT

A. Revisión de algunos métodos para el análisis del Paraquat

La determinación del herbicida Paraquat, por separado, como en mezclas con otros componentes de su familia, como el Diquat, tanto en formulaciones comerciales y muestras ambientales (agua, suelo, etc.), como en fluidos biológicos (sangre, orina, etc.) ha sido bastante estudiada por diferentes métodos, entre los cuales pueden citarse; la cromatografía a gas (CG)⁽¹¹⁾, cromatografía a gas acoplada a espectrometría de masas (CG-MS)⁽¹²⁾, cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)⁽¹³⁾, electroforesis capilar (EC)⁽¹⁴⁾, Polarografía⁽¹⁵⁾, Potenciometría directa con electrodos Ion-selectivos⁽¹⁶⁾, Inmuno-ensayos⁽¹⁷⁾, Espectrofotometría⁽¹⁸⁾, Espectrofluorimetría, entre otras.

Para el presente trabajo nuestro interés se centró en la técnica Espectrofotométrica, principalmente por su simplicidad, bajo costo y robustez.

Calderbank y colaboradores reportaron en 1961, la determinación de Paraquat⁽¹⁸⁾ y Diquat⁽¹⁹⁾ con ditionito de sodio. Utilizando este mismo reactivo Yuen y colaboradores⁽²⁰⁾ proponen un método para la determinación de una mezcla de Paraquat y Diquat.

El análisis por inyección en flujo (FIA), primera de las metodologías en flujo, es extremadamente simple en su concepción pero extraordinariamente ingeniosa en su desarrollo. La muestra en estudio es inyectada dentro de la solución transportadora (en el caso de tratarse de una única línea de flujo como se verá más adelante se tienen algunas limitaciones). En el camino al detector ocurrirán la Interdispersión de la muestra y la reacción química formando el

producto de interés analítico, que es detectado y presentado gráficamente como una señal analítica en función del tiempo "Diagramas".

De esta manera podrá llevarse a cabo el análisis inyectando sucesivamente una muestra tras otra, agregando elevada frecuencia de análisis y muchas otras ventajas. En el caso del Paraquat se utiliza ampliamente el método de análisis por inyección de flujo (FIA) con ditionito de sodio. Por ejemplo, Y. Chico Guijarro y colaboradores⁽²¹⁾ proponen FIA con detección espectrofotométrica para determinar Paraquat directamente. En algunos casos se requiere separar el Paraquat por extracción con solventes o la preconcentración con resinas de intercambio iónico⁽²²⁾ T. Pérez-Ruiz y colaboradores⁽²³⁾, proponen el método FIA con detección espectrofluorimétrica para el Diquat, este último grupo de investigación desarrolló también un método para a determinación simultánea de Diquat y Paraquat⁽²⁴⁾.

La técnica estándar para el análisis de Paraquat según la EPA⁽²⁵⁾ es la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), con la inyección de los estándares de concentración conocida y las muestras dentro de una columna cromatográfica, en donde se experimentará una separación debido a diferentes interacciones entre el solvente, la columna y el analito. El tiempo de retención para el herbicida Paraquat contenido en los estándares y la muestra será el mismo, por lo que es posible cuantificarlos.

En el manual de métodos de la RSCH (The Royal Society of Chemistry) se presenta el método⁽²⁶⁾ espectrofotométrico clásico para la determinación tanto de Paraquat como de Diquat en agua potable y de río, con una etapa de preconcentración con resinas de intercambio iónico.

B. Método Espectrofotométrico para la detección del Paraquat

La Espectrofotometría⁽²⁷⁾ se basa en las medidas de absorción de la radiación ultravioleta o visible y puede considerarse un proceso de dos etapas, en principio se presenta una excitación de la especie en estudio a un estado electrónico excitado, resultado de la absorción de un fotón de energía, el cual tiene un tiempo de existencia muy breve (de 10^{-8} a 10^{-9} s), como segunda etapa, ésta energía absorbida debe disiparse a través de los muchos procesos de relajación entre los que puede citarse la conversión en calor (la forma más común), descomposición de la especie absorbente en nuevas especies químicas o procesos de reemisión fluorescente o fosforescente.

Las transiciones en que participan electrones π , σ , n , comprenden principalmente moléculas e iones orgánicos y algunos aniones inorgánicos. Todos los compuestos orgánicos pueden absorber radiación electromagnética porque todos contienen electrones de valencia que pueden ser excitados a niveles de energía más altos, puede observarse transiciones electrónicas entre ciertos niveles de energía por absorción de radiación siendo las más comunes $\sigma \rightarrow \sigma^*$, $n \rightarrow \sigma^*$, $n \rightarrow \pi^*$, $\pi \rightarrow \pi^*$. En las transiciones $\sigma \rightarrow \sigma^*$, un electrón de un orbital de enlace σ es excitado al correspondiente orbital de anti-enlace, la energía requerida para esta transición es grande y corresponde a las frecuencias en la región de ultravioleta al vacío. Las transiciones $n \rightarrow \sigma^*$, son de menor energía que las transiciones $\sigma \rightarrow \sigma^*$ y pueden provocarse por radiación en la región de 150 a 250nm. La mayoría de las aplicaciones de la espectroscopia de absorción de compuestos orgánicos se basa en transiciones de electrones n o

π al estado excitado π^* , pues las energías requeridas para estos procesos se encuentran entre 200 y 700nm lo que es experimentalmente conveniente.

En lo cuantitativo la ley de Lambert-Beer proporciona la relación entre la absorbancia de la solución y la concentración: $A = \epsilon b C$, donde A es la absorbancia de la muestra, ϵ es la absortividad molar ($\text{cm}^{-1} \text{mol}^{-1} \text{L}$), b es el paso de luz (cm) y C es la concentración de la muestra (mol L^{-1}). Basados en la relación presentada anteriormente es posible construir graficas de absorbancia contra la concentración, conocidas como curvas de calibración, las cuales permiten por interpolación establece la concentración de una muestra desconocida de acuerdo con la medida de su absorbancia. El procedimiento descrito podrá aplicarse entre ciertos rangos, el limite inferior es conocido como limite de detección, y debajo de él no será posible la detección del analito.

Al aumentar la concentración se pierde la linealidad de esta curva, se prefiere no realizar determinaciones fuera de este rango lineal.

La instrumentación básica requerida para realizar una determinación espectrofotométrica se presenta a continuación en la figura 10.

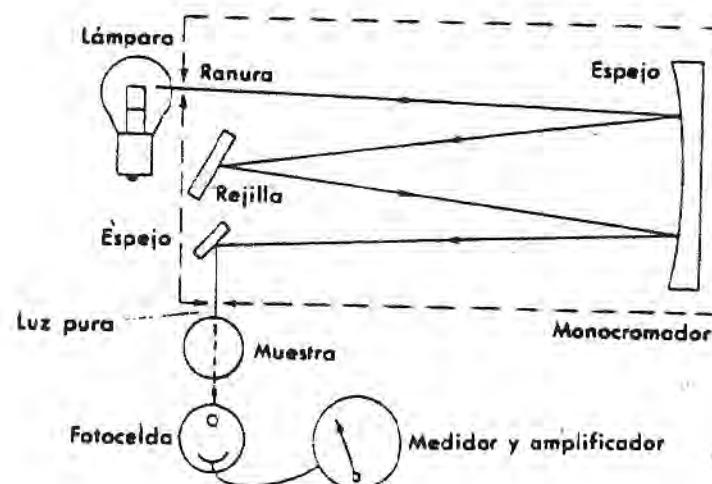


Figura 10. Esquema básico de un espectrofotómetro.

En el caso de los análisis en flujo, básicamente no se necesita ningún cambio en el espectrofotómetro, solo se requiere modificar la celda de tal manera que permita el ingreso y salida de líquidos. Diversos modelos fueron propuestos y actualmente se ha generalizado el uso de la celda de flujo mostrada en la figura 11, que evita la retención de burbujas de aire

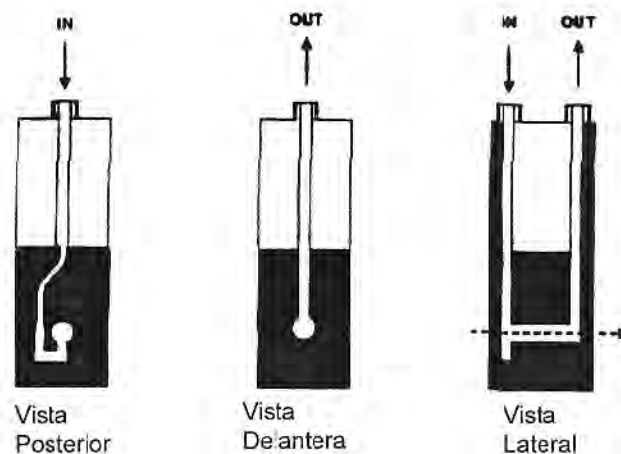


Figura 11. Celda espectrofotométrica para análisis en flujo, *IN* indica entrada de líquido, *OUT* indica salida de líquido.

El trabajo con metodologías en flujo requiere registrar la señal (absorbancia, fluorescencia, potencial, etc.) en función del tiempo (Diagrama), para esto deberá acoplarse al sistema, un clásico registrador en papel o la captura de datos por computadora mediante una placa de adquisición y un software adecuado.

IV ANÁLISIS POR INYECCIÓN SECUENCIAL (SIA)

“Una vez que usted agota todas las posibilidades y falla, allí mismo aparece una solución, simple y obvia, altamente notoria para cualquier otro”

Snafu.

IV. ANÁLISIS POR INYECCIÓN SECUENCIAL (SIA)

A. ANTECEDENTES

A medida que creció la necesidad de realizar mayor cantidad de análisis en menor tiempo comenzaron a buscarse nuevas formas de realizar las operaciones, primero se utilizó el criterio de la realización de varios análisis en paralelo, cuando esto no fue suficiente se buscó el desarrollo de diversos procesos de automatización⁽²⁸⁾, en la figura 12 se muestra comparativamente tres de los muchos procesos utilizados hasta el presente.

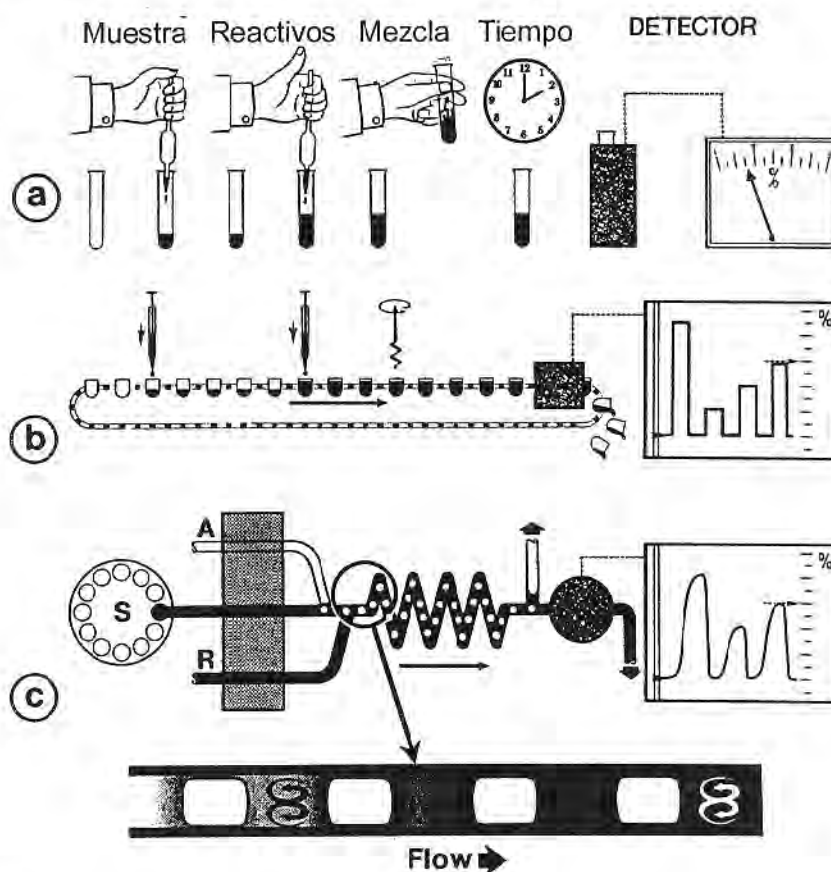


Figura 12. Operaciones analíticas manuales y automatizadas, a) análisis manual, b) analizador discreto, c) analizador de flujo continuo segmentado.

En la figura 12.a) se muestran las diversas etapas del análisis químico en secuencia. Es de resaltar que la realización de un análisis y otros sucesivos, requiere de que estos sean reproducibles y será una función de la buena

realización de cada una de las etapas en los intervalos de tiempo adecuados. Con la finalidad de lograr aumentar la frecuencia analítica se deben procesar "simultáneamente" varias muestras. En la figura 12.b) se muestra un típico proceso de "automatización" de las diversas etapas utilizando máquinas para aumentar la repetibilidad.

El diseño de esta "línea de análisis" es siempre específico y por lo tanto sólo será útil para la tarea diseñada. Como puede desprenderse de lo anterior el costo de instalación de estos sistemas de análisis discretos es grande y la posibilidad de modificación para cumplir diferentes tareas es bastante reducida.

En la figura 12.c) se muestra un analizador de flujo continuo segmentado con burbujas de aire, aquí la muestra y el reactivo son transportados hasta las proximidades del detector, delimitados entre 2 burbujas de aire, las que luego son retiradas para la lectura de la señal. Este sistema de análisis fue muy aplicado especialmente en análisis clínicos.

B. Descripción de la técnica de análisis por inyección secuencial (SIA)

J. Ruzicka y G. Marshall ⁽²⁹⁾ propusieron en 1990 la técnica de análisis por inyección secuencial (SIA), que comparte con análisis por inyección en flujo (FIA), propuesta por J. Ruzicka y H. Hansen ⁽³⁰⁾ en 1975, muchas virtudes, entre las cuales puede citarse: buena precisión, posibilidad de mecanización y automatización del análisis químico, gran versatilidad para adaptar varias metodologías analíticas envolviendo métodos de separación y preconcentración, como extracción con solventes, intercambio iónico, diálisis, entre otras. En FIA el uso de múltiples líneas de transmisión de flujo permite incorporar varios reactivos ⁽³¹⁻³⁵⁾, sin embargo esta configuración mecánica compleja del sistema implica la necesidad de re-calibraciones frecuentes. De igual modo, el consumo de reactivos es relativamente alto debido a que se tiene un sistema de flujo continuo, aunque este consumo es mucho menor al de los análisis tradicionales. El análisis por inyección secuencial (SIA) tiene usualmente frecuencia analítica menor, que FIA, pero no exige demasiado mantenimiento y debido a su configuración mecánica de línea única, no requiere recalibrar el sistema tan frecuentemente como en los sistemas FIA, a esto se suma la practicidad para alternar el análisis pues usualmente basta cambiar las soluciones (transportadora y reactivos) para realizar la determinación de analitos totalmente diferentes. La ventaja principal de SIA es la gran economía de la muestra y de los reactivos lo que implica la generación mínima de residuos. A pesar de existir modelos comerciales tanto de sistemas FIA y SIA, siempre es necesario el montaje previo del sistema de análisis, a fin

de acoplar las diferentes etapas para la determinación analítica, como por ejemplo la preconcentración en el caso de que las concentraciones del analito resulten muy bajas, buscando desarrollar un sistema mecanizado o automatizado que sea capaz de realizar todas las etapas del análisis. A continuación se presenta el esquema de un sistema SIA típico (Fig. 13)

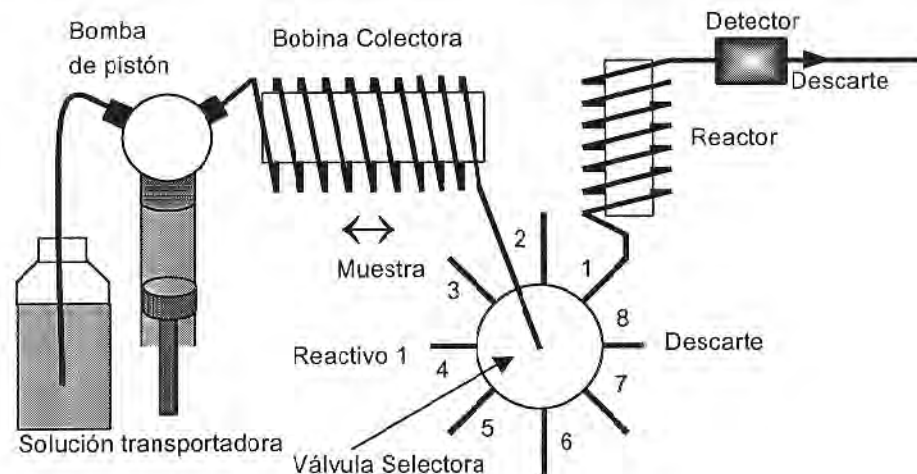


Figura 13. Configuración del sistema de Análisis por Inyección Secuencial (SIA)

Las partes de un sistema SIA son: Bomba de pistón (con una válvula que puede comunicarla con la solución transportadora o a la línea de flujo), una válvula selectora, que es el componente principal del sistema con varias puertas existiendo una común, que tiene acceso a cada una de las otras, individualmente. La unión de la válvula con la bomba de pistón es realizada mediante una bobina colectora, configurando un sistema de única línea de transmisión. Las puertas de la válvula son conectadas a reactivos, muestras, estándares, detector, reservorio para acumulación de residuos, sistemas de preconcentración o separación, etc., dándole versatilidad al sistema.

La señal obtenida de la absorbancia como una función del tiempo es similar a la registrada en FIA convencional, un registro típico es presentado en la figura 14.

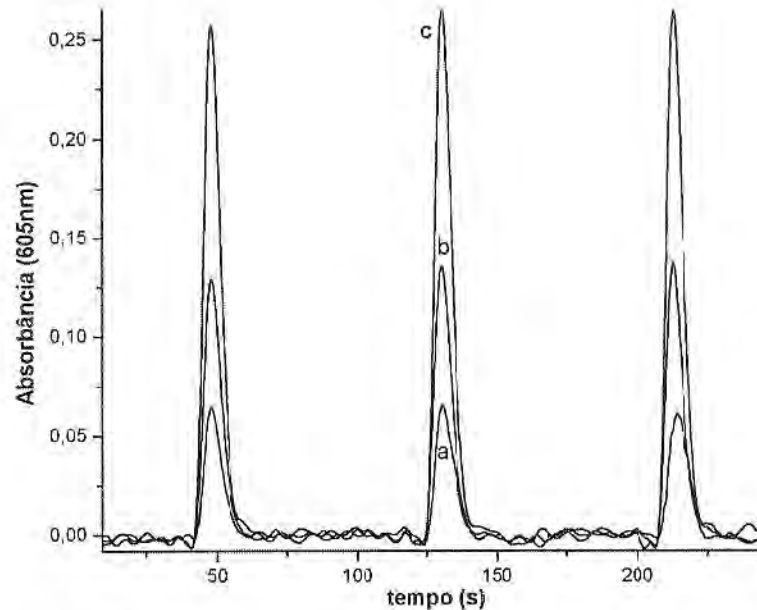


Figura 14. Ejemplo de registro típico de la señal analítica obtenida en condiciones optimizadas, Longitud de onda = 605nm, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 0.1%(m/v), Solución transportadora: Tampón Borato 0,05M pH=9, Caudal de flujo 75 $\mu\text{L}/\text{seg}$, Camino analítico 50 cm., Volumen de muestra 300 μL , **a** 2 mg/L, **b** 4 mg/L **c** 8 mg/L. Instrumento, espectrofotómetro Micronal B382.

En los sistemas SIA siempre es necesario una computadora con interfase a la bomba, a la válvula y al detector, con un software apropiado, para el control sincronizado del movimiento de ellos, así como para la adquisición de datos. En el caso de sistemas FIA el control por computadora no siempre es necesario, y en general es operado manualmente.

El principio de todos los métodos analíticos clásicos es realizar la medición de la señal analítica cuando el sistema alcanza el estado estacionario⁽³⁶⁾, es decir el momento en el cual la variación de la señal es despreciable, una de las dificultades para comprender el modo de operación de las metodologías en flujo es que no se requiere alcanzar el estado estacionario para realizar el análisis, tan solo es necesario trabajar en condiciones controladas, como se muestra en la figura 15, si todos los estándares y la

muestra se analizan en el tiempo A tendremos una respuesta con adecuada repetibilidad, lo mismo sucedería al elegir B.

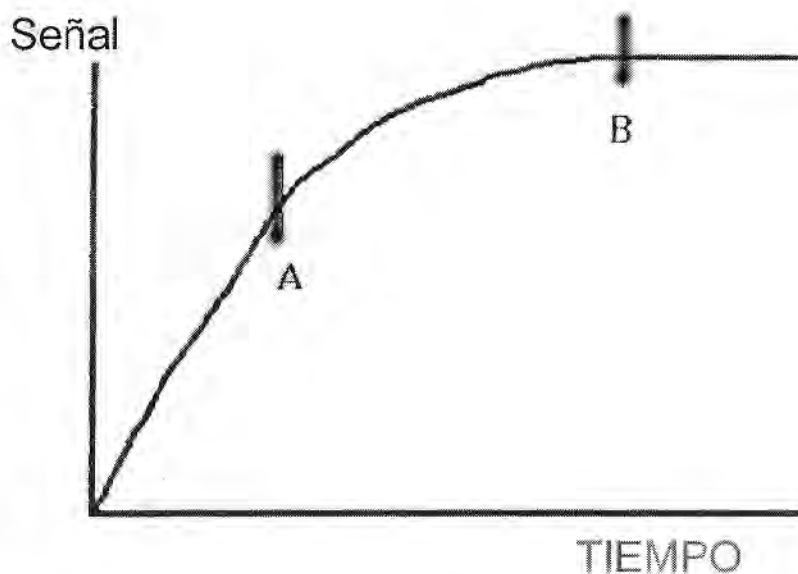


Figura 15. Desarrollo de la señal analítica en función del tiempo, A tiempo en el cual se realiza la medición, B tiempo en el cual se realiza otra medición, cualquiera de ellos puede utilizarse, para construir una curva de calibración y el respectivo análisis de varias muestras.

Lo anterior se traduce en el control estricto de dos variables; Tiempo de residencia T_r y dispersión D .

El tiempo de residencia T_r , viene dado por el intervalo entre el inicio del contacto entre los reactivos y el analito, y el momento en el cual los productos de reacción pasan a través del detector. La dispersión D se refiere a la dilución que experimentan todos los líquidos de la zona de reacción (muestra, reactivos y productos de reacción) al moverse en una línea de flujo dentro de una solución transportadora y se cuantifica comparando la señal (proporcional a la concentración) producida por un colorante llenando todo el sistema (D^0), respecto a la señal producida por la inyección del mismo colorante en el lugar de la muestra (D_1) de acuerdo con la siguiente expresión $D = D^0/D_1$ donde

usualmente se utiliza la medida de la absorbancia del colorante como los valores, D^0 , D_1 , por lo que la expresión resulta: $D = A^0/A_1$, la figura 16 muestra el perfil de concentración obtenido en función del tiempo.

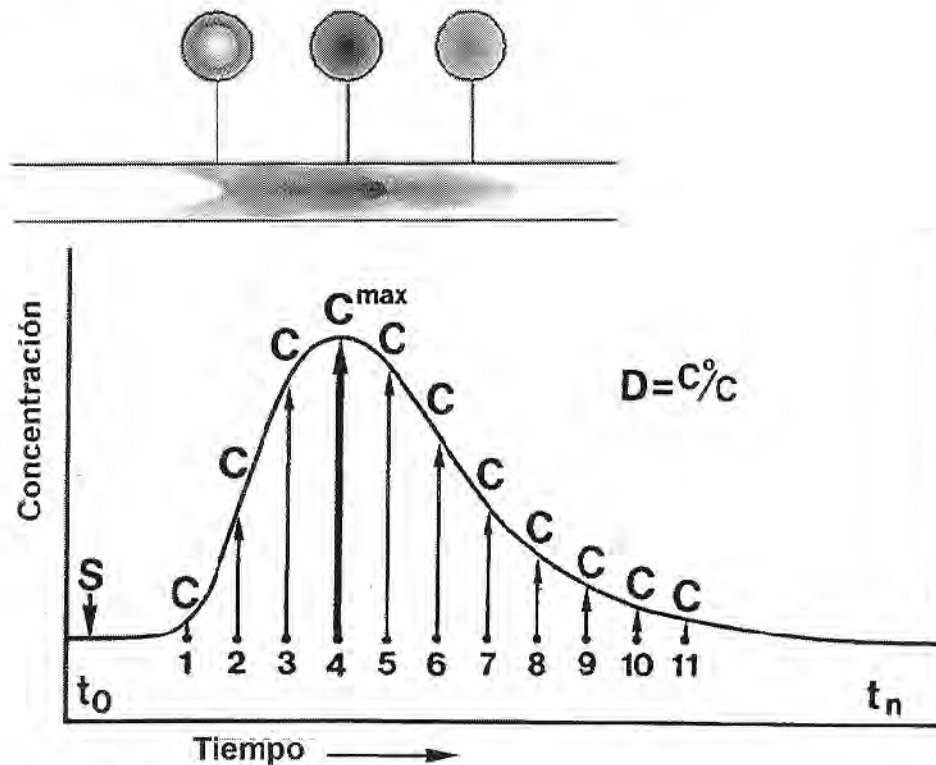


Figura 16. Dispersión del sistema, C^{\max} indica el momento en que el producto de reacción atraviesa el detector.

Al mantener controlados estos dos parámetros tenemos un método con todas las características analíticas necesarias. Una usual concepción equivocada es que basta colocar los reactivos con el analito en contacto en una línea de flujo, y enviarlos al detector para conseguir resultados excelentes, nada más alejado de la realidad. Las variables clásicas del análisis en flujo, Volumen de muestra, longitud de la bobina de reacción y Caudal de envío al detector deben pasar por un proceso de evaluación en donde se obtendrá los mejores valores de operación, igualmente las variables químicas como pH, composición de la solución transportadora, etc. deben ser evaluadas a fin de

mantenerlas controladas, solo después de tomar en cuenta todos estos parámetros nos encontramos frente a un método analítico seguro.

Muchas aplicaciones de SIA⁽³⁷⁻³⁸⁾ se presentan en la literatura, una revisión de aplicaciones de sistemas SIA para el monitoramiento de parámetros ambientales⁽³⁹⁾ fue presentada recientemente.

La determinación de pesticidas es hoy en día un interesante campo de investigación, dadas las implicaciones ambientales que esta clase de compuestos traen consigo. Debido a sus múltiples ventajas la técnica de análisis por inyección en flujo con detección espectrofotométrica⁽²¹⁾ y espectrofluorimétrica⁽²³⁾ ha sido bastante utilizada. En el caso del Paraquat, uno de los herbicidas más utilizados en el mundo, el desarrollo en este sentido ha sido importante. Los niveles de concentración encontrados en muestras ambientales (aguas, suelos, sedimentos, vegetales, alimentos, etc.) son generalmente bajos, aunque deban ser monitoreados, debido al elevado grado de toxicidad de muchos de los pesticidas utilizados, por ello también la automatización o mecanización de las etapas de análisis en sistemas SIA o FIA es un interesante campo de investigación. Existe un gran potencial para las aplicaciones prácticas, una vez que varios de los inconvenientes relacionados con la exposición del analista son minimizados y la frecuencia de análisis de la espectrofotometría clásica se ve incrementada notablemente.

Por lo tanto, comparando las metodologías FIA ya presentadas en la literatura, este trabajo de tesis logra constituir un sistema SIA mucho más robusto de análisis, con gran economía de muestra y reactivos, que genera poca cantidad de residuos y aumenta notablemente la frecuencia de análisis de la espectrofotometría tradicional.

V. OBJETIVOS

“Créanme mis estimados colegas, cuando yo digo es así, entonces así es”

W. Nernst

V. OBJETIVOS

Presentar el desarrollo de un método analítico en flujo, basado en análisis por inyección secuencial (SIA), utilizando detección espectrofotométrica, para la determinación del herbicida Paraquat, en muestras de formulaciones comerciales y en un medio de cultivo de hongos (trabajo en colaboración cuyo objetivo es destruir al herbicida), dejando sentadas las bases para el desarrollo de las metodologías en flujo.

VI. PARTE EXPERIMENTAL

“Ir en contra del pensamiento dominante de nuestros amigos, de la mayoría de la gente que vemos a diario, es tal vez, el acto de heroísmo más difícil de que podamos ser capaces”

Isaac Newton

VI. PARTE EXPERIMENTAL

A. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Equipamiento Utilizado

Se utilizó un sistema FIALAB 3500 con el software FIALAB 4.0, distribuido por la empresa ALITEA USA, sistema automatizado para el análisis por inyección secuencial (SIA) e inyección en flujo (FIA), que acopla una bomba de pistón, una válvula de dos vías, para entrada y salida de líquidos del pistón, una bomba peristáltica, y una válvula de múltiples puertas (8 en el modelo utilizado), todos estos elementos en interfase con un computador, son controlados por el software FIALAB 4.0 de modo sincronizado incorporando también la adquisición de datos.

Para la detección se utilizó un Espectrofotómetro de un solo haz, MICRONAL B382 con celda de flujo de cuarzo, de 10 mm de camino óptico (Fig. 11). Los tubos de conexión utilizados en todo el sistema fueron de teflón con 0.8mm de diámetro. Para las diluciones se utilizó pipetas automáticas de la marca Gilson de 100 μ L, 1000 μ L y 5000 μ L, las cuales trabajan en los rangos de. 20 -100 μ L, 200-1000 μ L y 1000-5000 μ L.

2. Reactivos Utilizados

- Paraquat, (C₁₂H₁₄N₂Cl₂.4H₂O), dicloruro, *1,1'-dimetil-4,4'-bipiridilium, tetra hidratado*, distribuido por Chem Service con 99% de pureza.
- Ditionito de sodio, (Na₂S₂O₄) distribuido por MERCK.(87%)
- Ácido Bórico (H₃BO₃) distribuido por J. T. Baker(99,6%)
- Ácido clorhídrico, HCl distribuido por MERCK(37%*m/m*)
- Hidróxido de sodio NaOH, distribuido por J. T. Baker(99%)
- Agua destilada

3. Procedimiento para la determinación Espectrofotométrica de Paraquat con el sistema SIA.

A continuación se presenta el procedimiento de análisis con el sistema SIA, utilizando el único reactivo, ditionito de sodio, siendo la configuración necesaria representada en la figura 13.

- Inicialmente se lava el sistema con la solución transportadora (Tampón borato 0.05M, pH=9.0). Los canales usados para aspirar el reactivo, ditionito de sodio (puerta 4) y la muestra (puerta 3) son llenados con la respectiva solución y el exceso es expelido a través de una puerta auxiliar (puerta 8).
- Un volumen predeterminado de solución transportadora (3000 μ L) es aspirado para dentro de la jeringa, siendo que este volumen es suficiente para, en las etapas posteriores, transportar la zona de reacción hasta el detector y lavar el sistema, dejándolo listo para la muestra siguiente.
- La válvula selectora gira hasta la puerta 4, entonces un movimiento del pistón, aspira un volumen de 50 μ L del reactivo 1 (ditionito de sodio) para dentro de la bobina colectora. El uso del pistón confiere mayor robustez al sistema, también es posible utilizar una bomba peristáltica, siendo que en este caso los volúmenes aspirados son determinados por el tiempo de movimiento de la bomba, por la velocidad de rotación, así como por el diámetro interno de los tubos usados.
- La válvula gira entonces hasta la puerta 3, y enseguida se aspira un volumen de muestra (300 μ L), a un caudal de flujo de 50 μ L/s, que se posiciona dentro de la bobina colectora. Durante el giro de la válvula, para evitar problemas de diferencias de presión y la consecuente formación de burbujas de aire, la bomba de pistón permanece detenida.

- Se inicia la adquisición de datos, mientras que un nuevo movimiento de la válvula coloca la bobina colectora y el detector (ligado a la puerta 1) en contacto.
- Enseguida se inicia la inyección de las zonas de muestra y reactivo, a través de una bobina de reacción (reactor de la figura 13) hasta el detector, vaciándose la jeringa. En este camino ocurre la Inter.-dispersión de muestra y reactivo, así como la reacción de interés y el posterior lavado del sistema.
- Como se puede notar un software apropiado y un computador con interfase para control de la bomba y de la válvula resultan esenciales. La rutina presentada puede repetirse cuantos ciclos sea preciso.

4. Protocolo general para la determinación espectrofotométrica de Paraquat con el sistema SIA.

La rutina presentada anteriormente (IV.A.3), se traduce en un programa construido con el software FIALAB 4.0, de muy fácil preparación y modificación, pues en él constan todas las ordenes en la forma de comandos (Volúmenes, Caudales, tiempos, posición de la válvula, etc.). Debido a esto se facilita el estudio de las diferentes variables presentadas en IV.B., por ejemplo en el caso de necesitar variar el volumen, sólo se ingresa el nuevo valor y se realiza el análisis sin mayores modificaciones. Los pasos a seguir en un análisis químico se presentan a continuación:

- a. Para la preparación de las soluciones, estándares y muestras, se utiliza una solución stock de 1000mg/L, por pesada de 0.1218g de Paraquat ($C_2H_{14}Cl_2 \cdot 4H_2O$) y enrace en un matraz volumétrico de 100ml con agua

destilada. De acuerdo al rango de concentración necesitado se prepara alternativamente soluciones intermediarias de 100mg/L o 10mg/L, por dilución en agua. Los estándares, utilizados en todos los análisis son *preparados a partir de estas soluciones por dilución en tampón borato* pH=9.0 y concentración 0.05M. Por ejemplo para preparar 10mL de una solución de 1mg/L a partir del stock de 100mg/L diluimos 100 μ L con el tampón antes mencionado.

En cuanto a las muestras analizadas, se realizó diluciones para conseguir *trabajar en el rango de la curva de calibración.*

El ditionito de sodio se prepara por pesada directa de 0.1g de ditionito de sodio enrasados a 100mL con el tampón borato, esta solución es inestable y debe ser preparada nuevamente luego de dos horas.

- b. Se dispone la muestra y el reactivo(ditionito de sodio) en las puertas *adecuadas y se inicia la rutina de análisis con el sistema SIA mostrado anteriormente(contenida en el programa), para cada muestra se repite tres veces el análisis, los datos son colectados mediante el sistema de registro en papel o con la tarjeta de adquisición de datos como un archivo con extensión "dat", estas graficas de absorbancia (o alguna otra señal, fluorescencia, potencial, etc.) en función del tiempo, obtenidas con el sistema SIA se llaman Siagramas.*
- c. Se mide la altura de pico en los "Siagramas". Con los valores obtenidos se hace el tratamiento estadístico, calculando el promedio y la desviación estándar, para luego construir gráficas, con el objetivo de mostrar el efecto de alguna variable o para cuantificar, interpolando el valor hallado de concentración en la curva de calibración, previamente construida.

B. Determinación de los parámetros de operación del método SIA**1. Determinación de la longitud de onda de trabajo.****a. Espectro UV/ Visible del Paraquat.**

Se preparó una solución de Paraquat con una concentración de 5×10^{-5} M de acuerdo con lo expresado en la sección VI.A.4.a., por dilución de la solución stock de 1000mg/L en tampón borato con pH=9 y concentración de 0.05M, enseguida se realizó el barrido espectral en el rango de 200 a 700nm, tomando como blanco la solución tampón obteniendo la curva espectral (Fig. 17)

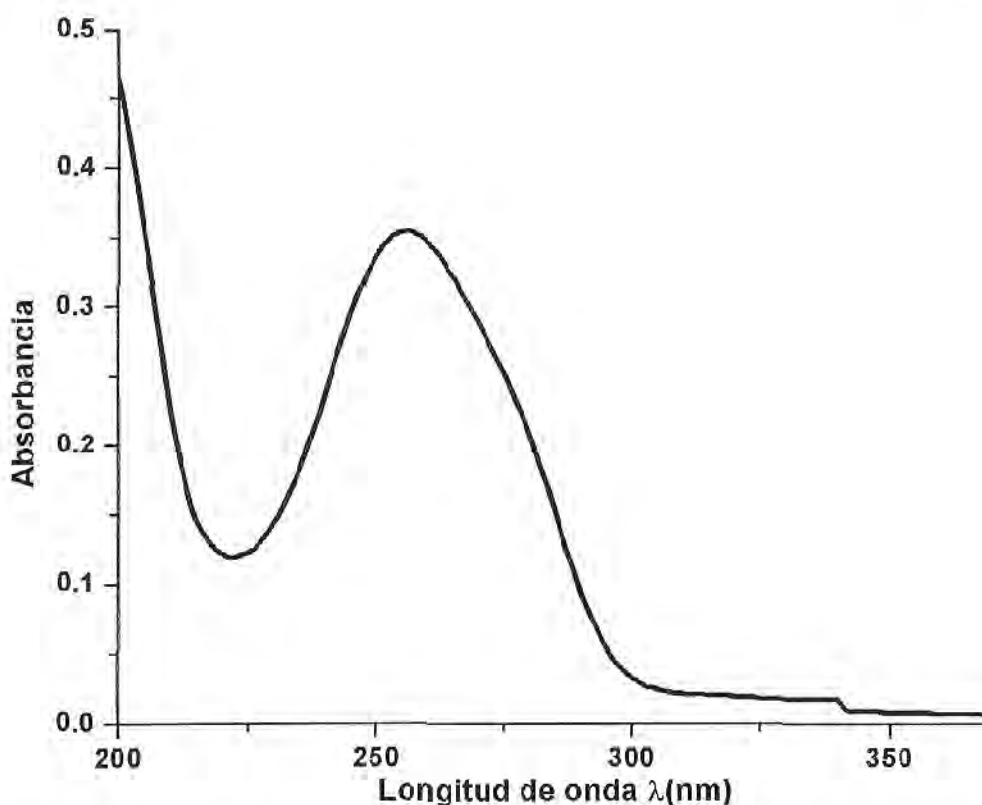


Figura 17. Espectro de absorción del Paraquat en solución de tampón borato pH = 9, 0,05M, concentración del Paraquat 5×10^{-5} M.

Como puede observarse se presenta una intensa banda de absorción en 256nm, encima de 350nm prácticamente no se presenta absorción por lo que no se muestra esa región.

b. Espectro UV/Visible del radical Paraquat PQ⁺

La información de mayor utilidad para el desarrollo de nuestro método se encuentra en el espectro de absorción molecular del Paraquat reducido con ditionito de sodio (Fig.18). En esta etapa la reducción se realiza sólo por la mezcla en una fiola de 10mL, de 165 μ L de la solución stock de 1000mg/L de Paraquat y ditionito de sodio 0.1%(m/v) en tampón borato pH=9 y concentración 0.05M. En estas condiciones la reacción es rápida y el producto estable hasta por 30 minutos, suficiente como para realizar la medición, notándose que se presentan tres máximos de absorción, el primero en 383nm, el segundo en 394nm y el tercero en 605nm.

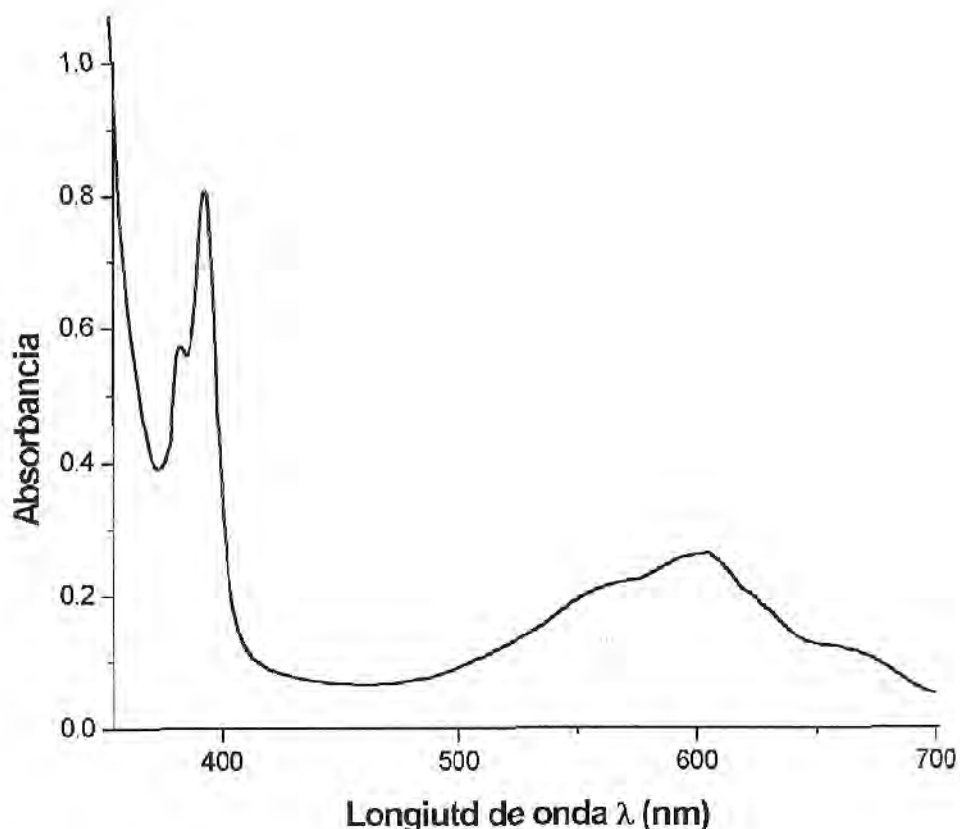


Figura 18. Espectro de absorción del Paraquat reducido con ditionito de sodio, concentración del Paraquat 5×10^{-5} M, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 0.1% (m/v), tampón borato pH = 9, 0.05M

En la figura 19 se observan los espectros de absorción molecular del Diquat y Paraquat, reducidos por ditionito de sodio.

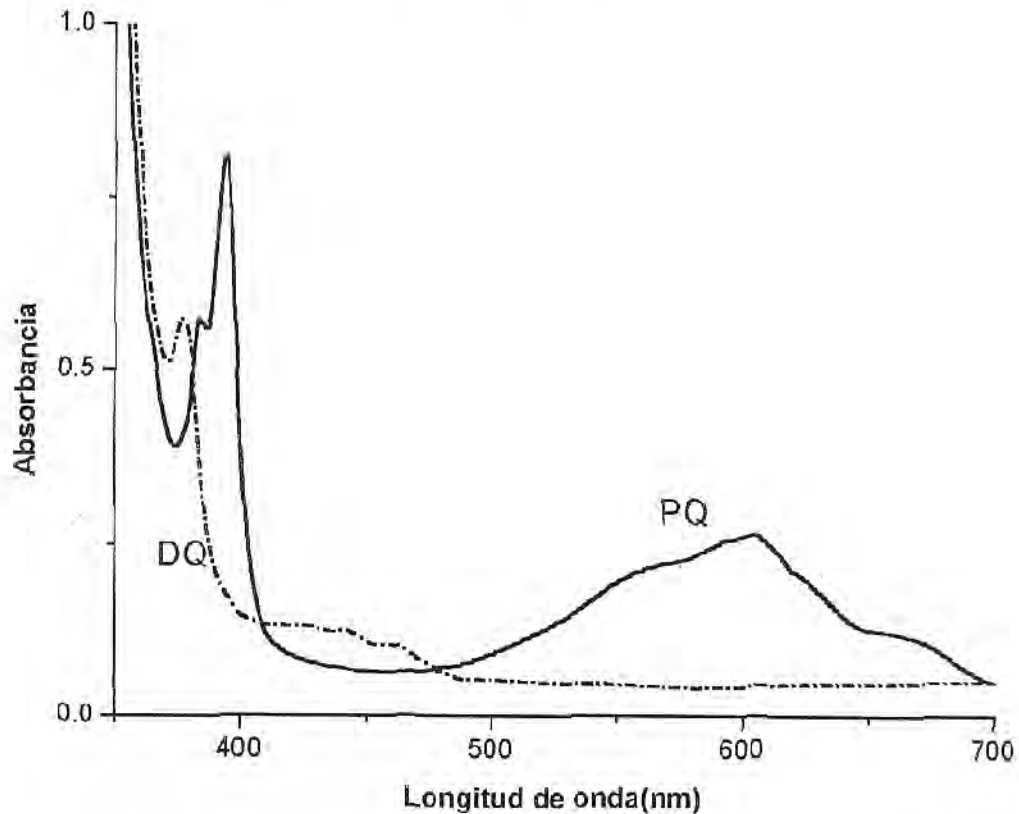


Figura 19. Espectros de absorción del Paraquat y Diquat reducidos por ditionito de sodio, concentración de ambos 5×10^{-5} M en solución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 0.1%(m/v), tampón borato pH = 9, 0.05M

En el caso del Diquat, la longitud de onda de máxima absorción se presenta en 377nm y algún grado de absorción en 426nm, 441nm, 458nm(aún cuando no son máximos de absorción) se observa que el Paraquat reducido presenta un máximo de absorción a 605nm región en que la absorción del Diquat es casi despreciable.

Con la finalidad de evitar posibles interferencias espectrales, cuando se realizan las determinaciones analíticas del Paraquat en la longitud de onda 394nm, y a pesar de tener menor intensidad, se elige como longitud de onda de

trabajo el máximo en 605nm, por estar alejado de la zona donde el Diquat absorbe fuertemente, y en la región visible. Como se sabe en la región ultravioleta muchos compuestos orgánicos absorben intensamente convirtiéndose en potenciales interferentes espectrales.

Las absorptividades molares estimadas en esta longitud de onda son: 5260 L mol⁻¹ cm⁻¹ en el caso del Paraquat, y 920 L mol⁻¹ cm⁻¹ para el Diquat.

2. Optimización del volumen de muestra.

En el presente estudio se verificó la influencia del volumen de muestra en el rango de 50 a 600µL. Se utilizó el procedimiento de análisis mecanizado, controlado por un programa del FIALAB 4.0, que cumple las etapas descritas anteriormente VI.A.3., este programa fue modificado muy fácilmente para variar el volumen de muestra. La detección se realiza con el espectrofotómetro Micronal B 382. La preparación del estándar se realizó por dilución, tomando 300µL de la solución stock de 100mg/L de Paraquat y enrasando en una fiola a 10mL con tampón borato. Este procedimiento para preparar el estándar de prueba y el equipamiento utilizado se utiliza en los estudios posteriores. Por simplicidad se presentan los resultados sólo en el rango de 100 a 400 µL (Fig. 20) puesto que los valores encima de 400 µL presentan pequeñas variaciones.

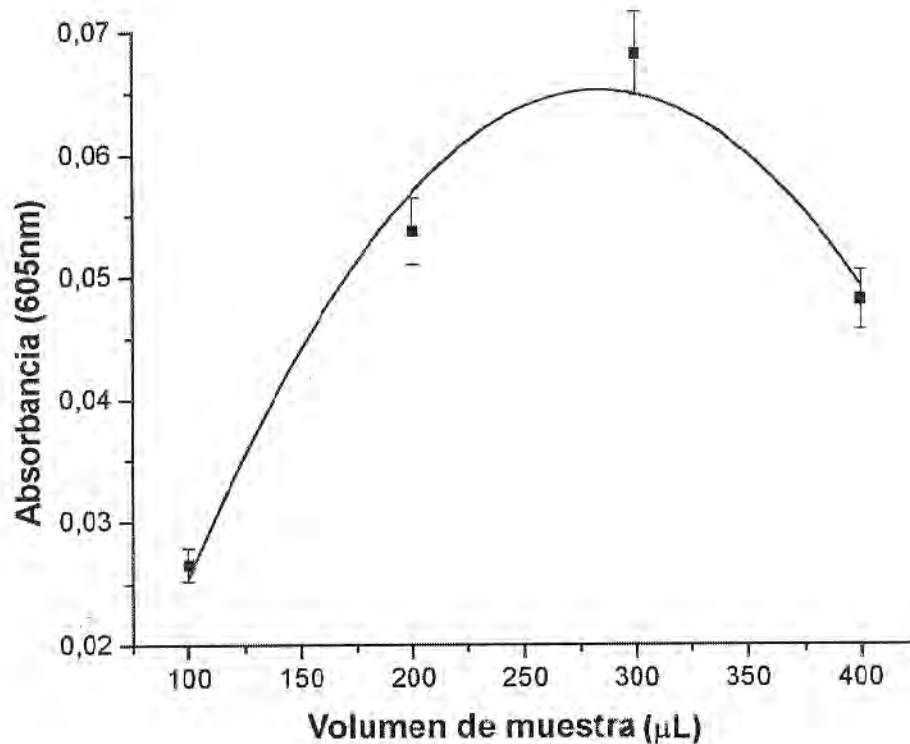


Figura 20. Influencia del volumen de muestra en la señal. Condiciones utilizadas: Longitud de onda = 605nm, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 0.05%(m/v), Solución transportadora: tampón Borato pH=9, 0.05M, Concentración del estándar de Paraquat 3mg/L, Caudal de flujo 75 $\mu\text{L/s}$, longitud del reactor 50 cm, Instrumento espectrofotómetro Micronal B382.

En este caso se puede observar el aumento progresivo de la absorción conforme se aumenta el volumen de muestra, hasta obtener un máximo, a un volumen de 300 μL . Luego se observa una rápida caída de la absorción (respuesta típica de los sistemas SIA) a medida que se incrementa el volumen.

Por lo tanto el volumen de muestra escogido para ser utilizado en estudios posteriores fue 300 μL .

3. Optimización de la longitud del camino analítico

Se considera como camino analítico la distancia entre el punto de inyección de la muestra y la celda de detección, usualmente los estudios se realizan variando la longitud de la bobina de reacción (se desprecia los segmentos desde los extremos de la bobina hasta la celda y válvula de inyección).

Como ésta variable se encuentra íntimamente relacionada con el tiempo de residencia y la dispersión del sistema, se espera que las reacciones rápidas necesiten menor longitud de camino analítico y un mayor caudal de flujo, los resultados se presentan en la figura (Fig. 21)

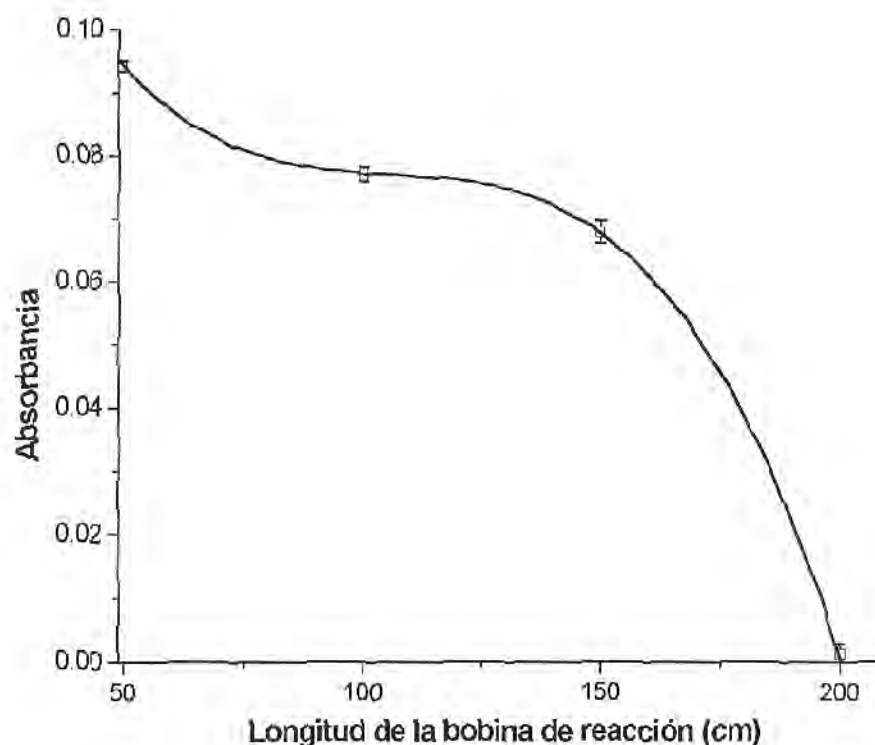


Figura 21. Influencia de la longitud del camino analítico sobre la señal, condiciones utilizadas: Longitud de onda = 605nm, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 0.01%(m/v), Solución transportadora: Tampón Borato pH=9, 0.05M, Concentración del Paraquat 3 mg/L, Volumen de muestra 300 μL , caudal 75 $\mu\text{L}/\text{seg}$. Instrumento, espectrofotómetro Micronal B382.

Según lo esperado, un menor camino analítico proporciona la mayor señal, se encontró que al utilizar una bobina de reacción de 50 cm se obtiene el mayor valor de absorbancia, siendo por eso utilizada en los estudios posteriores.

4. Optimización del caudal de flujo

Para realizar este experimento se utilizó la secuencia de pasos anteriormente descrita (VI.A.3) variando el caudal directamente en el programa, los valores obtenidos fueron promediados y luego graficados (Fig. 22).

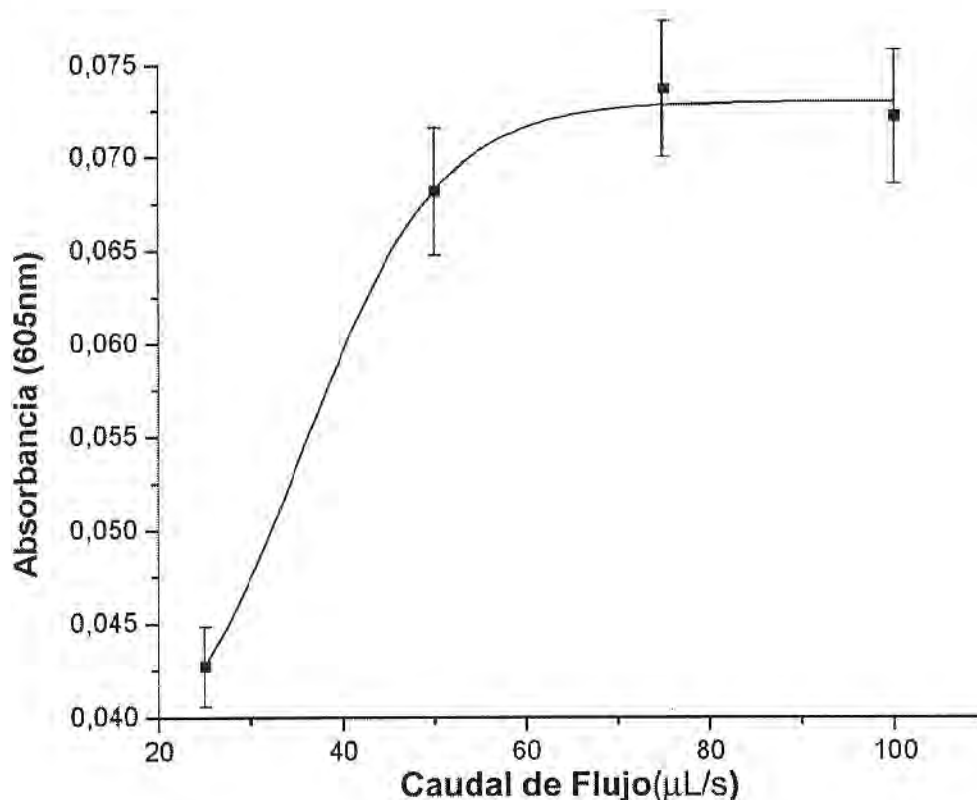


Figura 22. Influencia del caudal de flujo en la señal, condiciones utilizadas: Longitud de onda = 605nm, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 0.1% (m/v), Solución transportadora: Tampón Borato 0,05M pH=9, Concentración del estándar de Paraquat 3 mg/L, Volumen de muestra 300 μL , camino analítico 50cm, instrumento espectrofotómetro Micronal B382.

De la misma manera que la longitud del camino analítico se encuentra relacionada con el tiempo de residencia y la dispersión del sistema, el caudal (la razón) de flujo permite manejar el tiempo de residencia si fuera necesario.

Se espera que reacciones rápidas necesiten menor tiempo de residencia en el sistema, motivo por el cual, un caudal alto favorece la señal.

En la figura 22, Se observa que las señales aparecen en tiempos diferentes como consecuencia del diferente caudal con que se realiza el envío al detector.

Como se esperaba, un caudal de flujo pequeño proporciona señales pequeñas, pues el producto de la reacción es inestable, y en el camino al detector se descompone y también sufre dispersión. Se observa también que en 75 $\mu\text{L/s}$ la señal se estabiliza. Sobre 100 $\mu\text{L/s}$ no se observa un aumento pronunciado en el valor de la señal, motivo por el que el caudal de flujo 75 $\mu\text{L/s}$ fue escogido para estudios posteriores.

5. Influencia de la solución transportadora en la señal.

En el análisis por inyección secuencial es preciso utilizar una solución transportadora (líquido que sirve para movilizar las soluciones), en la que el analito es usualmente inerte, siendo que el agua es siempre la primera opción.

En nuestro caso es preciso establecer un pH de trabajo fijo, para lo cual se utilizó en principio el tampón borato con pH 9 de concentración 0,5M⁽¹¹⁾, la elevada concentración causó problemas en la limpieza del sistema después del análisis, por lo que se modificó la concentración a 0.05M. En la práctica del análisis en flujo se procura también compatibilizar la composición de la muestra

6. Influencia del pH en la señal.

Se estudió el efecto del pH en la señal de detección del sistema SIA, variando el pH en el rango entre 7 y 10 (Fig. 24), utilizando un tampón borato de concentración 0.005M al cual se le regula el pH con NaOH 1M.

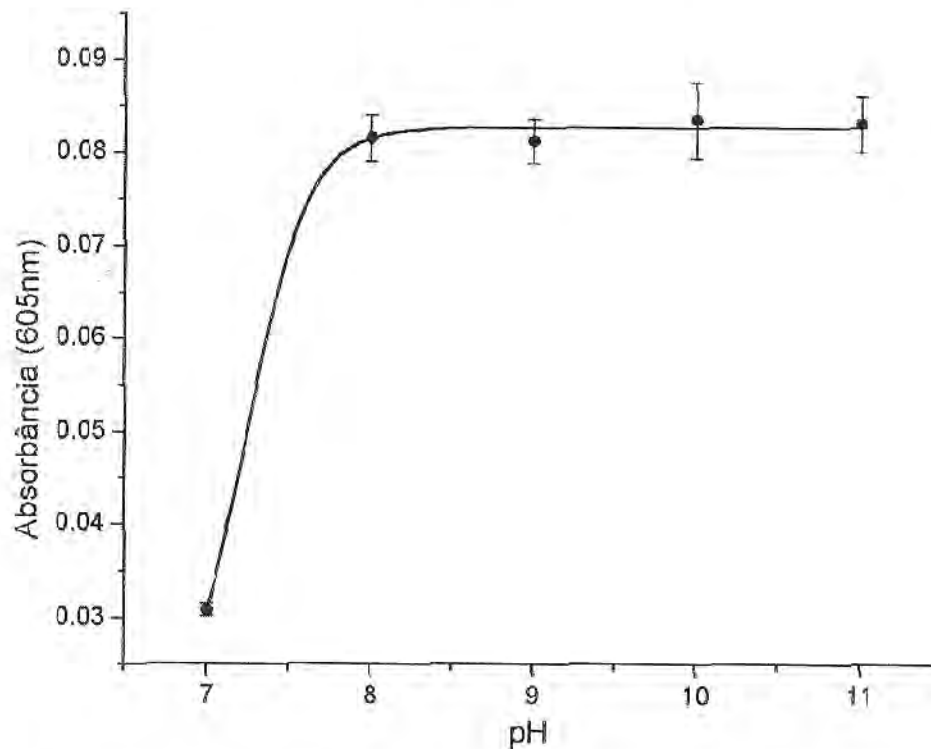


Figura 24. Influencia del pH en la señal de detección, para un estándar de 3 mg L^{-1} de Paraquat en solución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 0.1%(m/v), Condiciones: Longitud de onda = 605nm, Volumen de muestra $300 \mu\text{L}$, Camino analítico 50 cm, Solución transportadora, tampón Borato pH=Variable 0,05M, Instrumento espectrofotómetro Micronal B382.

Se observa que a un pH > 8 no se produce variación significativa, motivo por el cual para nuestro trabajo se escogió el pH 9, valor intermedio que asegura que la muestra se mantenga en esas condiciones.

7. Selección del ditionito de sodio como reductor del Paraquat.

El ditionito de sodio, es el reductor más usado para el análisis de Paraquat, desde el inicio del proyecto fue escogido como reactivo, en principio porque forma especies analizables por espectrofotometría, radicales libres coloridos, tanto con Paraquat y Diquat según se discutió en la parte II.1., figuras 3 y 4.

A pesar de la poca estabilidad del ditionito de sodio aún en solución tampón, dos horas, es simple de preparar y no es costoso (se requiere solo de 0,1% m/v).

8. Estudio de interpenetración de zonas

El estudio de interpenetración de zonas como su nombre lo indica tiene por finalidad observar la eficiencia de la mixtura con el aumento del volumen de reactivo. Para obtener las graficas se debe colocar la solución azul en el lugar de cada uno de los componentes de la zona de mixtura (posiciones 0, I, II) a continuación se presenta un grafico esquemático de la zonas(Fig. 25).

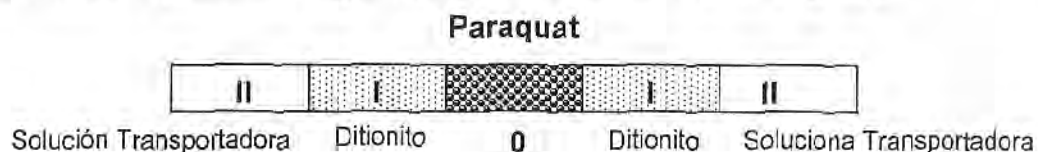


Figura 25. Zonas de reacción antes del envío al detector, (0) Paraquat, (I) Ditionito de sodio, (II) Solución transportadora.

El estudio de interpenetración de zonas presentado en la figura 26 es realizado con una solución de azul de bromotimol de concentración 4mg L^{-1} .

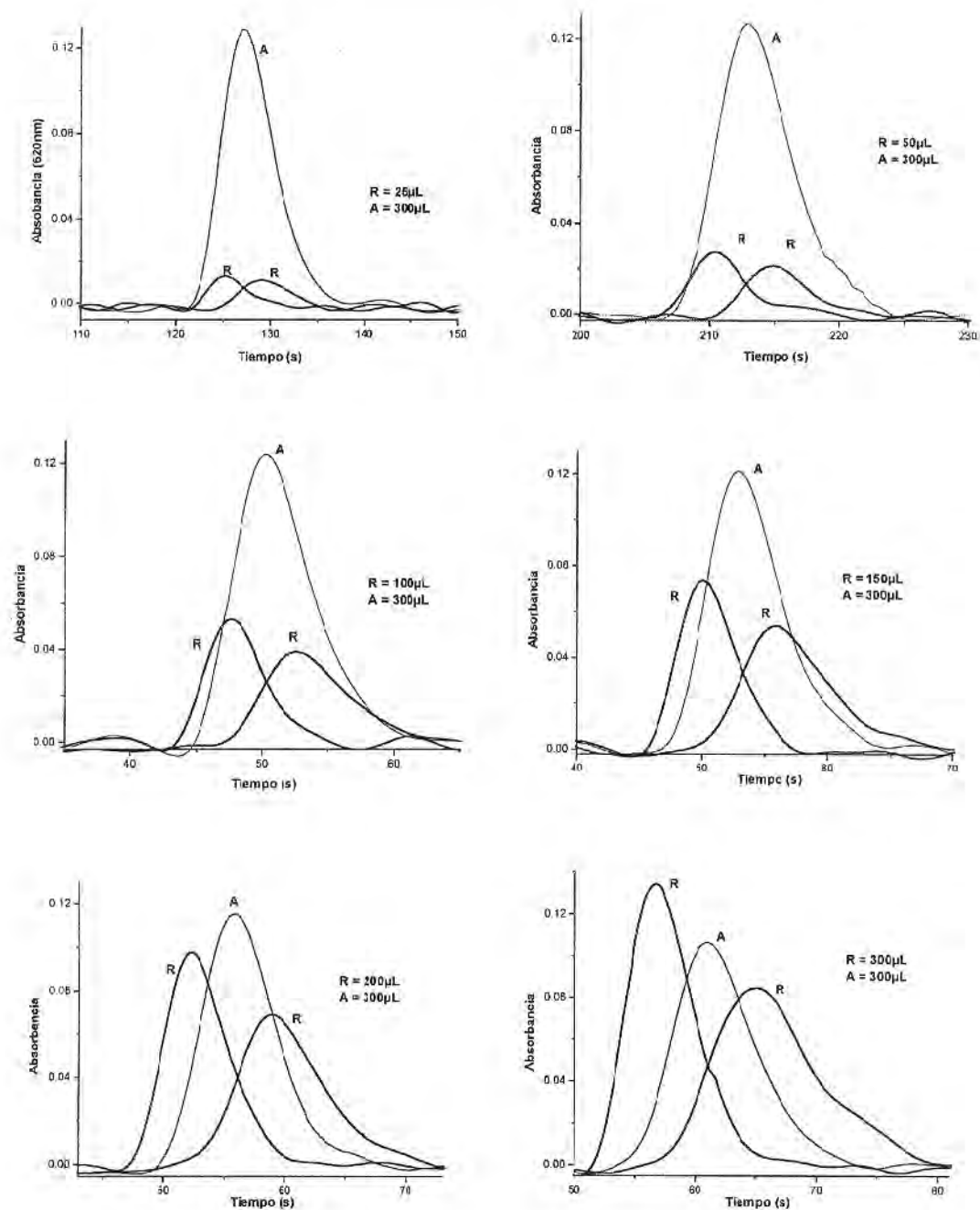


Figura 26. Influencia del volumen de reactivo en la señal analítica; En las graficas presentadas, cada pico es obtenido colocando el colorante azul de bromotimol en la concentración de 4mg L^{-1} en una puerta de la válvula y tampón borato 0.01M (que también actúa como solución transportadora) en las otras. Entre cada gráfico se varía el "volumen de reactivo", en el rango de $25\mu\text{L}$ a $300\mu\text{L}$, con el volumen de "muestra" fijo en $300\mu\text{L}$, Camino analítico 50 cm , caudal de flujo $75\mu\text{L/s}$. Longitud de onda de trabajo 620nm , Instrumento, espectrofotómetro Micronal B382.

Tanto en el método FIA como en el método SIA al obtener los mejores valores para las variables: Camino analítico, Caudal de flujo, y Volumen de muestra, estudiadas por el método univariado (en el cual el valor de una variable es modificado mientras las demás permanecen fijas), se consigue alcanzar una condición muy cercana a la condición optimizada. A continuación la secuencia de aspiración y la relación de volúmenes entre muestra y reactivo debe ser estudiada.

Considerando que sólo tenemos un reactivo, se utilizó la secuencia "sandwich" en la cual el analito queda confinado entre dos alícuotas de reactivo, formando una zona de mixtura que es enviada al detector, y considerando que en el camino analítico ocurre la reacción química y el proceso de dispersión.

De la figura 26 se puede concluir que los volúmenes pequeños propician mixtura eficiente, mientras que los volúmenes grandes de reactivo provocan la disminución de la señal de detección. En nuestro caso dos alícuotas con volúmenes de 50 μ L fueron suficientes para generar respuesta adecuada.

9. Influencia del "stopped flow" en la señal de detección.

Procurando observar mejor el efecto del tiempo de residencia en la señal analítica y el progreso de la reacción química, fue realizado un estudio con la técnica de "stopped-flow" (parada de flujo). El programa inicial fue modificado para conseguir detener el flujo en el momento que la zona de reacción se encuentre en la celda, de este modo la señal se fue monitoreando durante 120 segundos obteniéndose el gráfico de la figura 27.

El primer pico corresponde a un análisis rutinario mientras que en el segundo pico se realiza la parada de flujo descrita.

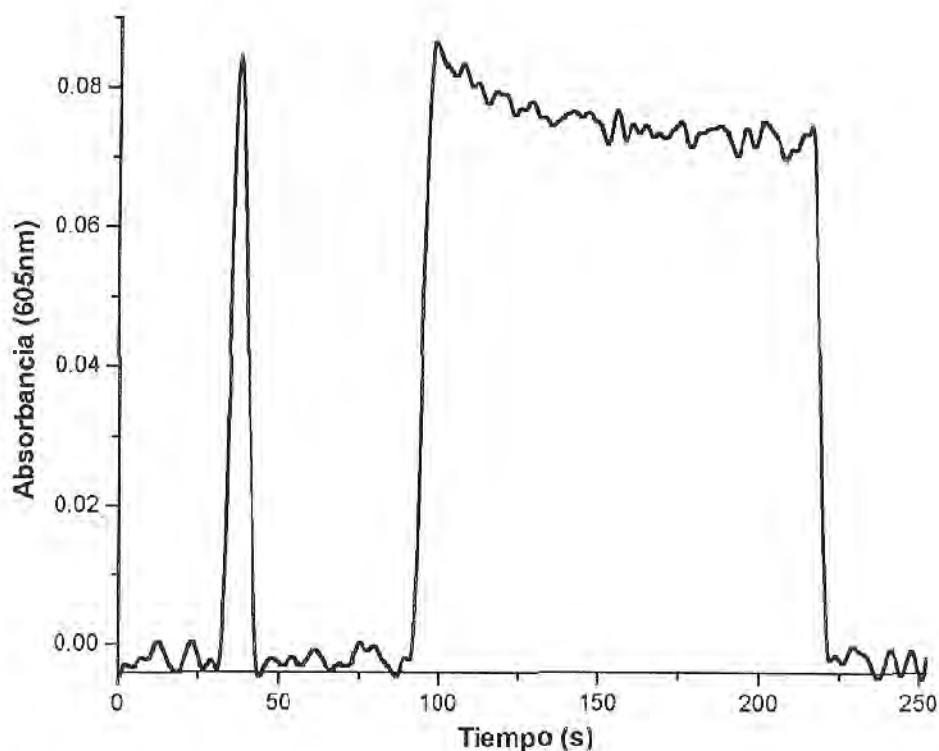


Figura 27. Influencia del stopped-flow en la señal, condiciones utilizadas: Longitud de onda $\lambda = 605\text{nm}$, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 0.1%(m/v), Solución transportadora: Tampón Borato 0,05M pH=9, Concentración del estándar de prueba: $3\ \mu\text{g}/\text{mL}$, Volumen de muestra $300\ \mu\text{L}$, Camino analítico 50 cm, caudal $75\ \mu\text{L}/\text{seg}$. Tiempo de parada 120 s. Instrumento espectrofotómetro Micronal B382.

Se puede observar que la señal analítica decrece con el tiempo, confirmando que el producto de la reacción no es estable y que no es ventajoso un aumento en el tiempo de residencia deteniendo el flujo, por lo que en estudios posteriores no se aplica el stopped-flow.

10. Estudio del coeficiente de dispersión.

El estudio del coeficiente de dispersión presentado (Fig. 28) es realizado con una solución de azul de bromotimol de concentración 4mg L^{-1} y Tampón Borato $0,01\text{M}$. Para obtener las graficas, primero se debe colocar la solución azul en el lugar de la muestra y realizar la rutina de análisis, se obtiene D_1 , enseguida se cambia la solución transportadora por el colorante llenando todo el sistema, de esta manera se obtiene D^0

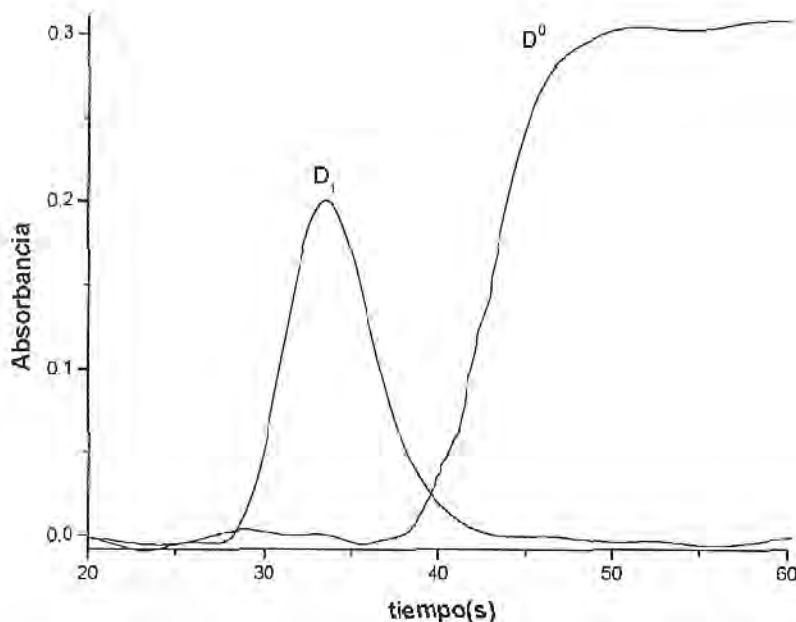


Figura 28. Estudio del coeficiente de dispersión, Colorante Azul de bromotimol 4mgL^{-1} , Longitud de onda = 600nm , Solución Transportadora.: Tampón Borato $0,01\text{M}$ $\text{pH}=9$, Volumen de "muestra" $300\mu\text{L}$, caudal de flujo $75\mu\text{L}/\text{seg}$. D^0 = Colorante en todo el Sistema, D_1 = reemplazando solo la muestra por el colorante, espectrofotómetro Micronal B382.

El coeficiente de dispersión D , obtenido por comparación de D^0 respecto D_1 tomando las respectivas absorbancias fue: $D=0.300/0.200 = 1.5$

Según los cálculos muestran existe una dilución moderada, lo que caracteriza según Ruzicka y Hansen un sistema con dispersión reducida⁽²⁸⁾.

11. Curva de calibración

Una vez que los estudios anteriores nos permitieron establecer los parámetros de operación adecuados, se inició el estudio cuantitativo, con la preparación de la curva de calibración. Para ello se prepararon soluciones de Paraquat en fioas de 10mL por dilución a partir de una solución estándar de 100mg/L (previamente preparada a partir de un estándar de 1000mg/L), en el rango de 0.1 mg/L a 20 mg/L. Utilizando el programa previamente preparado (VI.A.4.b) se realizó el análisis químico de cada estándar por triplicado, es decir, se repitió la rutina tres veces para cada muestra. A continuación se presentan los Siagramas obtenidos(Fig. 29)

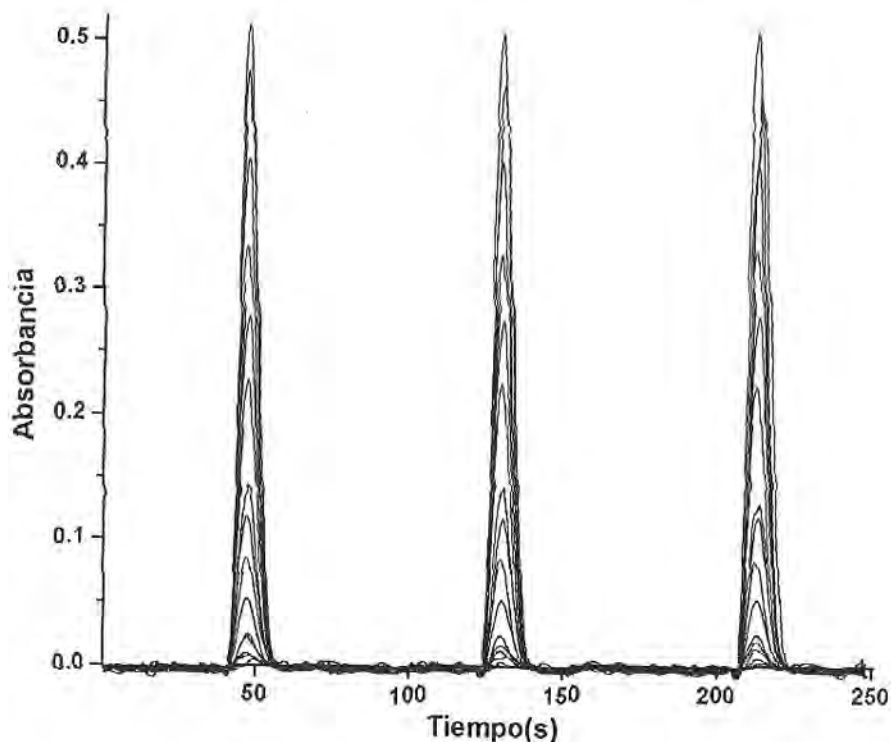


Figura 29. Siagrama en condiciones optimizadas, Longitud de onda = 605nm, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 0.1%(m/v), Solución transportadora: Tampón Borato 0,05M pH=9, Volumen de muestra 300 μL , Caudal de flujo 75 $\mu\text{L}/\text{seg}$. Camino analítico 50 cm, rango de trabajo de 0.1 mg/L a 20 mg/L de Paraquat. Instrumento, espectrofotómetro Micronal B382

La ampliación de uno de los picos (señal máxima), para varias concentraciones, permite observar la variación de la señal con la concentración, siendo que el tiempo en el que aparece la señal máxima es 47 segundos para cada concentración estudiada (Fig. 29)

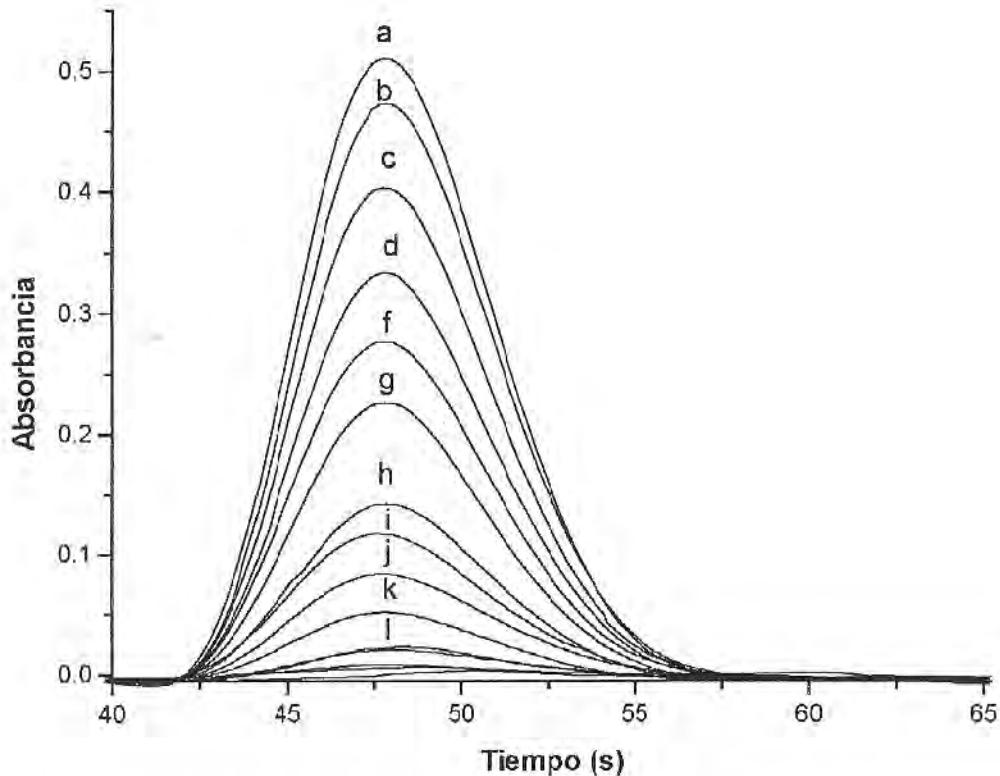


Figura 30. Ampliación de uno de los picos del Siagrama para varias concentraciones, Condiciones: Longitud de onda = 605nm, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 0.1%(m/v), Solución transportadora: Tampón Borato 0,05M pH=9, Volumen de 300 μL , caudal de flujo 75 $\mu\text{L}/\text{seg}$. Camino analítico 50 cm; Concentraciones de Paraquat: a 20 mg/L, b 18 mg/L, c 15 mg/L, d 12 mg/L, e 10 mg/L, f 8 mg/L, g 5 mg/L, h 4 mg/L, i 3 mg/L, j 2 mg/L, k 1 mg/L, l 0.8 mg/L, las concentraciones 0.5, 0.4, 0.2 mg/L, pueden ser observadas en una ampliación.

A partir de estos Siagramas obtenidos mediante adquisición de datos se puede realizar la medida de la absorbancia máxima (altura de pico). Una vez obtenidos los datos, se procedió al análisis de los mismos en los programas ORIGIN 6.0, y EXCEL 2000, se calculó, promedios y las respectivas

desviaciones estándar, los resultados se presentan en la tabla 5, aunque los picos aparecen a tiempos diferentes es de resaltar que para obtener cada uno de ellos la rutina de análisis se inicio nuevamente.

Concentración (mg/L)	absorbancia (Altura de pico) para tiempos diferentes			Absorbancia Promedio	Desviación Estándar
	T ₁	T ₂	T ₃		
0.2	0.0035	0.0020	0.0014	0.0023	0.0011
0.4	0.0063	0.0061	0.0046	0.0057	0.0009
0.5	0.0083	0.0110	0.0123	0.0105	0.0020
0.8	0.0206	0.0153	0.0182	0.0180	0.0027
1.0	0.0234	0.0230	0.0233	0.0232	0.0002
2.0	0.0516	0.0505	0.0510	0.0510	0.0006
3.0	0.0834	0.0833	0.0810	0.0826	0.0014
4.0	0.1172	0.1155	0.1164	0.1164	0.0009
5.0	0.1420	0.1403	0.1272	0.1365	0.0081
8.0	0.2263	0.2239	0.2222	0.2241	0.0021
10.0	0.2765	0.2741	0.2762	0.2756	0.0013
12.0	0.3331	0.3269	0.3291	0.3297	0.0031
15.0	0.4033	0.4010	0.3989	0.4011	0.0022
18.0	0.4733	0.4609	0.4519	0.4620	0.0107
20.0	0.5105	0.5047	0.5055	0.5069	0.0031

Tabla 5. Datos obtenidos para la curva de calibración de Paraquat, en absorbancia (altura de pico), a tiempos diferentes, T₁, T₂, T₃.

Una vez realizado el tratamiento de datos se construye la curva de calibración graficando los promedios de las absorbancias y las respectivas concentraciones (Fig. 31), se calcula en esta etapa la respectiva pendiente, el intercepto, y el coeficiente de correlación. Se observa que es posible trabajar en el intervalo de 0.1 a 20 mg/L con una linealidad y correlación aceptables, mejor linealidad se encuentra separando esta curva en dos, con intervalos de trabajo en el rango de 0.1 a 1.6 mg/L y de 1.6 a 6 mg/L fue suficiente para cubrir los requerimientos de las muestras analizadas.

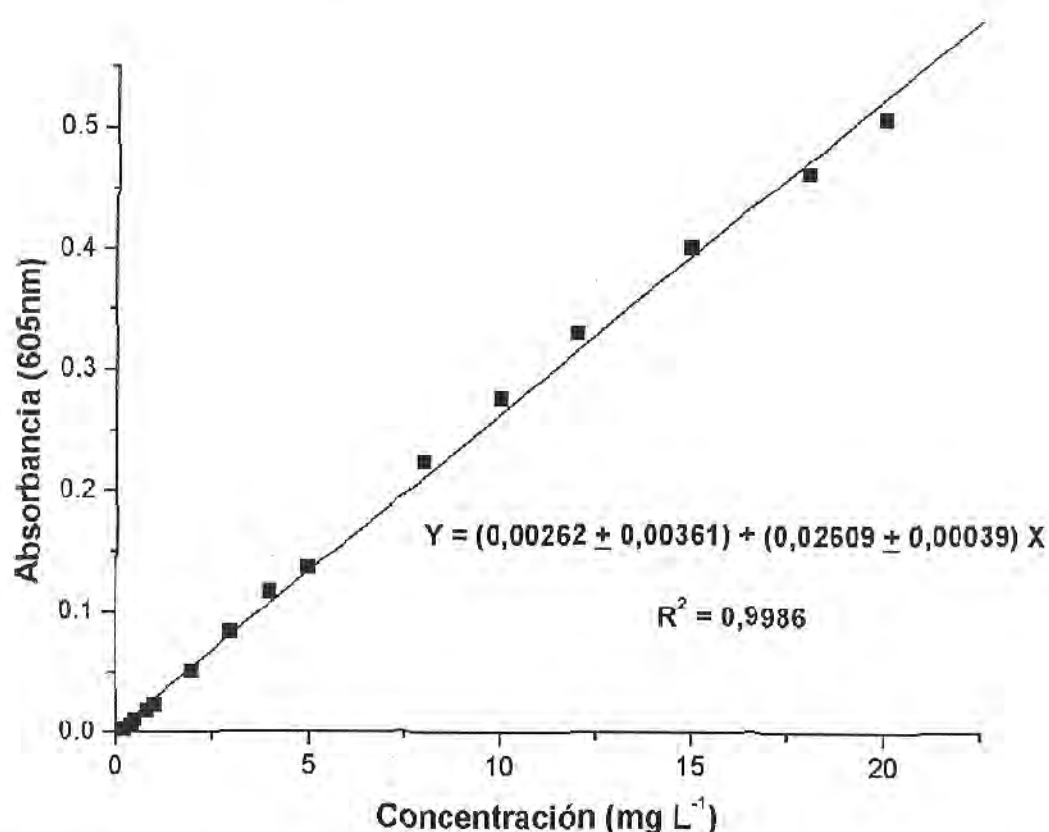


Figura 31. Curva de calibración en condiciones optimizadas, longitud de onda = 605nm, Na₂S₂O₄ 0.1%(m/v), Solución transportadora: Tampón Borato 0,05M pH=9, Volumen de muestra 300µL, Caudal de flujo 75µL/seg. Camino analítico 50 cm, rango de trabajo de 0.1 mg/L a 20 mg/L de Paraquat. Instrumento, espectrofotómetro Micronal B382.

En el caso del intervalo de concentración de 0.1 a 1.6 mg/L se construye la curva de calibración de la misma manera, aplicando el programa(VI.A.4.b) se obtiene los Siagramas (Fig. 32), por registro en papel, se miden las alturas, se realizan los cálculos y tabulan los datos(Tabla 6) para finalmente construir la curva de calibración utilizando la absorbancias promedio y las concentraciones(Fig. 33).

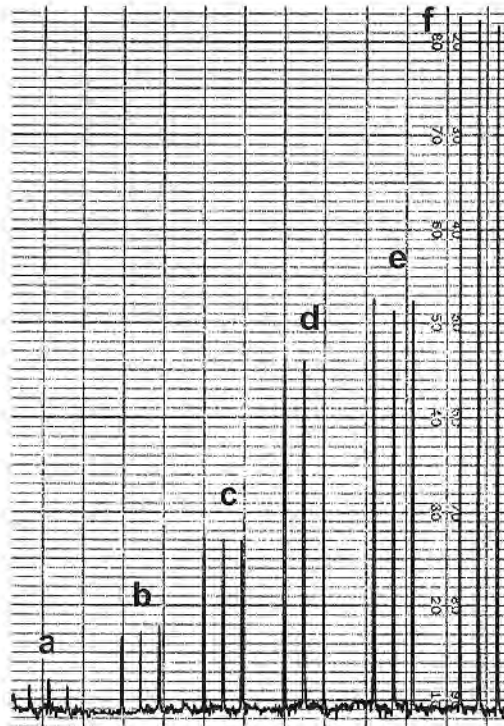


Figura 32. Curva de calibración en condiciones optimizadas, Longitud de onda = 605nm, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 0.1%(m/v), Solución transportadora: Tampón Borato 0,05M pH=9, Volumen de 300 μL , Caudal de flujo 75 $\mu\text{L}/\text{seg}$. Camino analítico 50 cm; a 0.1 mg/L, b 0.2 mg/L, c 0.4 mg/L, d 0.8 mg/L, e 0.1 mg/L, f 1.6 mg/L, de Paraquat. Instrumento, espectrofotómetro Micronal B382.

Altura de pico (cm.)			Absorbancia			Concentración (mg/L)	Absorbancia Promedio	Desviación Estándar.
0.6	0.7	0.6	0.0018	0.0021	0.0018	0.1	0.0019	0.0002
1.9	1.9	2.0	0.0058	0.0058	0.0061	0.2	0.0059	0.0002
4.3	4.2	4.1	0.0130	0.0127	0.0124	0.4	0.0127	0.0003
8.6	8.4	8.4	0.0261	0.0255	0.0255	0.8	0.0257	0.0003
9.9	9.8	9.9	0.0300	0.0297	0.0300	1.0	0.0299	0.0002
17.0	16.9	16.8	0.0515	0.0512	0.0509	1.6	0.0512	0.0003

Tabla 6. Datos obtenidos para la curva de calibración en el rango de 01 a 1.6 mg/L, de Paraquat en condiciones optimizadas.

En el programa ORIGIN 6.0 se grafica la curva de calibración y se calcula la pendiente, el intercepto, la desviación estándar y el coeficiente de correlación, los resultados se muestran en la Figura 33.

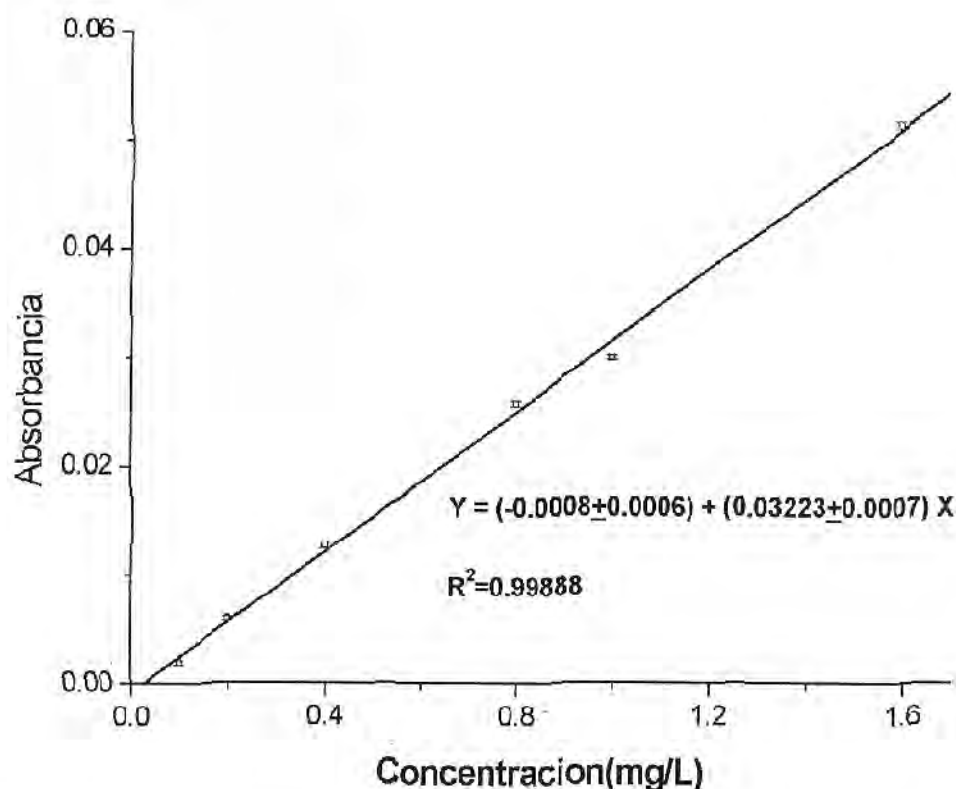


Figura 33. Curva de calibración en condiciones optimizadas, Longitud de onda = 605nm, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 0.1% (m/v), Solución transportadora: Tampón Borato 0,05M pH=9, Volumen de muestra 300 μL , Caudal de flujo 75 μL /seg. Camino analítico 50 cm, rango de trabajo de 0.1 mg/L a 1.6 mg/L, de Paraquat. Instrumento Espectrofotómetro Micronal B382.

Se observa una buena linealidad y una desviación estándar pequeña, características propias de la metodología de análisis por inyección secuencial con detección espectrofotométrica.

Para el caso del intervalo de concentración de 1 a 6 mg/L se construye la curva de calibración de la misma manera, aplicando el programa (VI.A.4.b) se obtiene los Siagramas (Fig. 34), se miden las alturas, se realizan los cálculos y tabulan los resultados (Tabla 7) para finalmente graficar la curva de calibración, en el programa Origin 6.0, utilizando las absorbancias promedio y las concentraciones (Fig. 35)

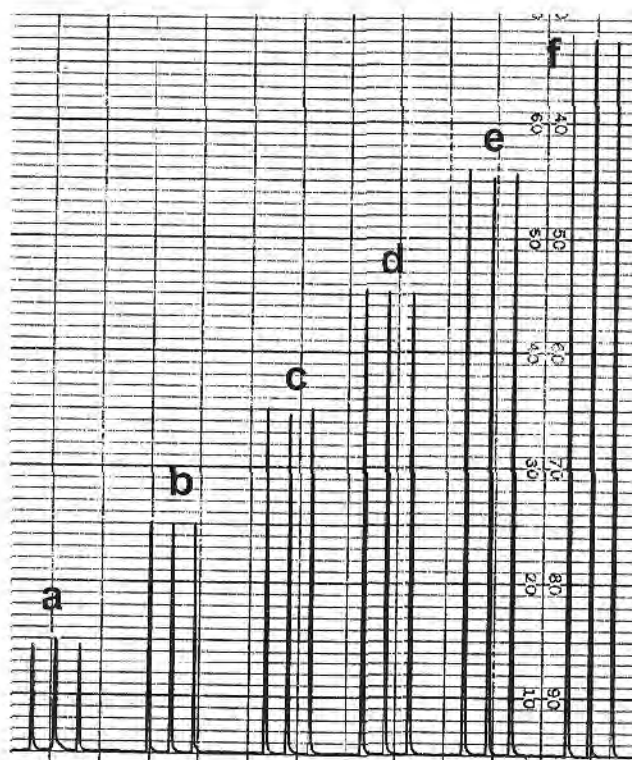


Figura 34. Curva de calibración en condiciones optimizadas, Longitud de onda = 605nm, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 0.1%(m/v), Solución transportadora: Tampón Borato 0,05M pH=9, Volumen de $300\mu\text{L}$, caudal de flujo $75\mu\text{L}/\text{seg}$. Camino analítico 50 cm, rango de trabajo de 1 mg/L a 6 mg/L, de Paraquat. Instrumento Espectrofotómetro Micronal B382.

Altura de pico (cm)			Absorbancia			Concentración (mg/L)	Absorbancia Promedio	Desviación Estándar
2.2	2.3	2.2	0.0349	0.0365	0.0349	1.0	0.0354	0.0009
4.6	4.6	4.6	0.0730	0.0730	0.0730	2.0	0.0730	0.0000
6.9	6.8	6.8	0.1095	0.1079	0.1079	3.0	0.1085	0.0009
9.3	9.2	9.2	0.1476	0.1460	0.1460	4.0	0.1466	0.0009
11.7	11.6	11.6	0.1857	0.1841	0.1841	5.0	0.1847	0.0009
14.4	14.3	14.3	0.2286	0.2270	0.2270	6.0	0.2275	0.0009

Tabla 7. Datos obtenidos para la curva de calibración en el rango de 1 a 6 mg/L de Paraquat.

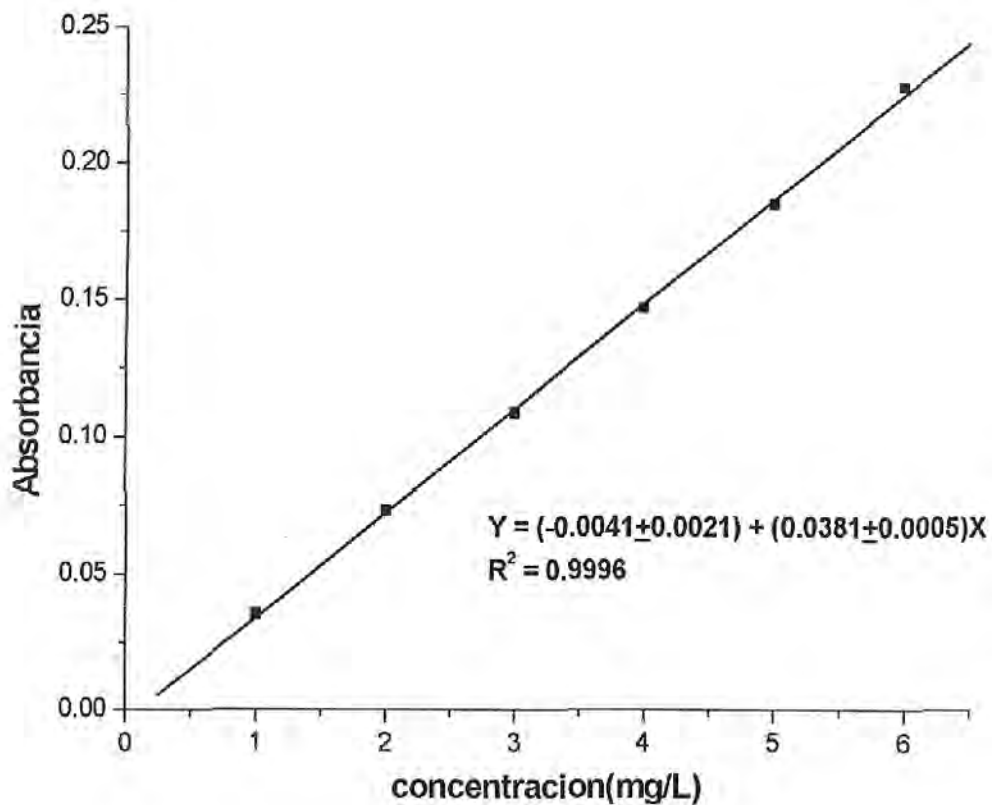


Figura 35. Curva de calibración en condiciones optimizadas, Longitud de onda = 605nm, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 0.1%(m/v), Solución transportadora: Tampón Borato 0,05M pH=9, Volumen de muestra 300 μL , caudal de flujo 75 $\mu\text{L}/\text{seg}$. Camino analítico 50 cm, rango de trabajo de 1 mg/L a 6 mg/L de Paraquat. Instrumento Espectrofotómetro Micronal B382.

12. Estudio de la Repetibilidad del método

En este estudio se utilizó un estándar de 5.0 mg/L, preparado por disolución a partir del stock de 10 mg/L de Paraquat. Repitiendo 11 veces la rutina de análisis antes descrita (VI.A.4.b), luego se evaluaron tanto el promedio como la desviación estándar.

A continuación se presenta el Siagrama obtenido(Fig. 36)

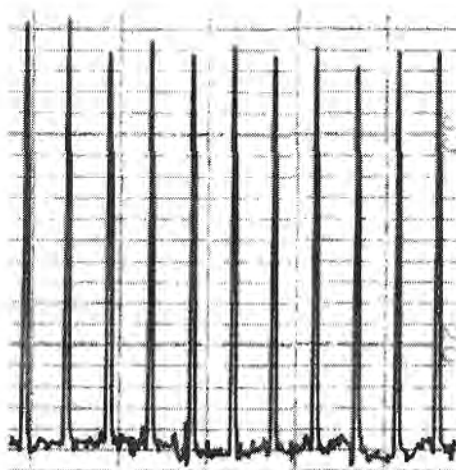


Figura 36. Estudio de la Repetibilidad del método, Longitud de onda = 605nm, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 0.1%(m/v), Solución transportadora: Tampón Borato 0,05M pH=9, Volumen de muestra 300 μL , caudal de flujo 75 $\mu\text{L}/\text{seg}$. Camino analítico 50cm, Estándar de 5.0 mg/L de Paraquat. Instrumento Espectrofotómetro Micronal B382.

Luego de la medida de las alturas y realizados los cálculos los resultados obtenidos se presentan en la tabla 7.

Nº de replica	Altura de Pico (cm)	absorbancia	Concentración (mg/L)
1	4.6	0.0144	0.47
2	4.7	0.0147	0.48
3	4.3	0.0134	0.44
4	4.4	0.0138	0.45
5	4.4	0.0138	0.45
6	4.5	0.0141	0.46
7	4.3	0.0134	0.44
8	4.4	0.0138	0.45
9	4.3	0.0134	0.44
10	4.5	0.0141	0.46
11	4.4	0.0138	0.45
Promedio			0.46
Desviación estándar			0.01

Tabla 7 Datos para la curva de calibración, obtenidos en el rango de 1 a 6 mg/L de Paraquat.

Los resultados obtenidos; promedio 0,46mg/L y 0,01 de desviación estándar con el método SIA propuesto resultan aceptables para el análisis realizado.

13. Estudio del Limite de detección y determinación del método

En este estudio, utilizando la rutina de análisis antes descrita (VI.A.4.b) se realizaron 11 replicas del blanco (el cual fue la solución transportadora colocada en el lugar de la muestra, obteniéndose un Siagrama atípico (Fig. 37) pues tanto la solución transportadora, y el reactivo Ditionito de sodio no absorben en la longitud de onda seleccionada 605nm.



Figura 37. Estudio del limite de detección del método, registro de 11 repeticiones del análisis, Longitud de onda = 605nm, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, 0.1%(m/v), Solución transportadora: Tampón Borato 0,05M pH=9, Volumen de muestra 300 μL , Caudal de flujo 75 μL /seg. Camino analítico 50 cm. Instrumento Espectrofotómetro Micronal B382.

Luego se realizó el cálculo considerando el limite de detección como: 3 veces la desviación estándar dividido por la pendiente de la curva analítica en las mismas condiciones de operación, en caso del limite de determinación se toma 10 veces la desviación estándar dividido por la pendiente de la curva analítica en las mismas condiciones de utilizadas en el análisis, como se mencionó anteriormente la solución transportadora y el reactivo no absorben en la longitud de onda de trabajo, por lo que se considera la medida del ruido para

los cálculos (Anexo 3). Con los resultados obtenidos se obtienen los valores que se muestran a continuación:

Límite de Detección =

$$3 (\text{desviación Estándar}) / (\text{pendiente de la curva de calibración})$$

$$\text{Límite de Detección} = 3 \times 0,0005 / 0,0326 = 0,0459 \text{ mg/L de Paraquat.}$$

Para el caso del Límite de determinación se realiza algo análogo pero tomando 10 veces la desviación estándar:

Límite de determinación =

$$10 (\text{desviación Estándar}) / (\text{pendiente de la curva de calibración})$$

Con lo que se obtiene:

$$\text{Límite de determinación} = 10 \times 0,0005 / 0,0326 = 0,1531 \text{ mg/L de Paraquat}$$

14. Numero de análisis por hora (Frecuencia analítica)

La frecuencia analítica operando en condiciones optimizadas fue de 59 muestras por hora, valor obtenido del reloj contador del programa FIALAB 4.0 que nos da el tiempo utilizado en cada análisis, una modificación en la rutina original incremento el flujo en las dos etapas que consumen más tiempo, cuando inicialmente la jeringa de pistón es llenada y después del análisis la etapa de lavado del sistema, muchas veces la espectrofotometría clásica quedó relegada a segundo plano debido a que usualmente un análisis podía resultar muy lento, con lo que la cantidad de muestras analizadas por hora resultaba pequeña, las metodologías en flujo puede contrarrestar ese efecto produciendo un método competitivo a todo nivel pues la frecuencia analítica puede aumentar mucho.

C. Resultados de la aplicación del sistema SIA en la determinación de Paraquat.

a. Formulaciones comerciales

En este caso fue elegido el producto comercial Gramoxone en cuyo envase consta el valor de 200g/L, dada la elevada concentración es preciso realizar diluciones del producto comercial para poder trabajar en el rango lineal de la curva de calibración, primero se prepara una solución intermediaria diluyendo 1mL de la muestra en una fiola con 100mL de agua destilada. Luego se preparo la muestra por dilución de 25 μ L de la solución anterior en una fiola de 10mL con tampón borato (pH 9 y concentración 0.05M)

Se lleva al modulo SIA la muestra y se repite la rutina de análisis 9 veces, los siagrama obtenidos se muestran en la figura 38.

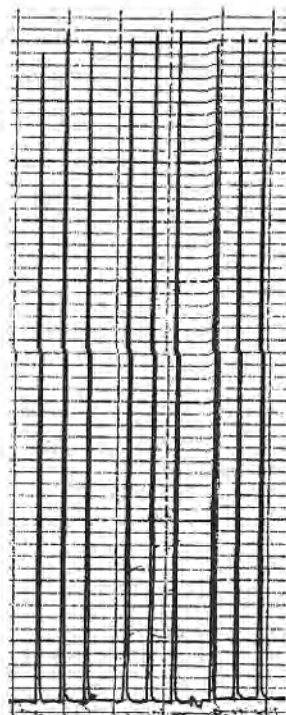


Figura 38. Siagrama del análisis de la formulación comercial Gramoxone, 9 análisis: Longitud de onda = 605nm, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 0.1%(m/v), Solución transportadora: Tampón Borato 0,05M pH=9, Volumen de muestra 300 μ L, Caudal de flujo 75 μ L/seg. Camino analítico 50 cm. Instrumento Espectrofotómetro Micronal B382.

A continuación se presenta la tabla 8 con los valores obtenidos para el análisis del herbicida.

Absorbancia	Concentración (g/L)	
0.1984	212.6	
0.2048	219.3	
0.2000	214.3	
0.2016	215.9	
0.2048	219.3	
0.2048	219.3	
0.2000	214.3	
0.2016	215.9	Desviación Estándar
0.2016	215.9	
Promedio	216.3	2.5

Tabla 8. Datos obtenidos en el análisis de Paraquat en la Formulación comercial Gramoxone condiciones: Longitud de onda = 605nm, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 0.1%(m/v), Solución transportadora: Tampón Borato 0,05M pH=9, Volumen de 300 μL , caudal de flujo 75 $\mu\text{L}/\text{seg}$. Camino analítico 50cm. Instrumento Espectrofotómetro Micronal B382.

Estos resultados son bastante concordantes con los valores que constan en el producto por lo que puede considerarse el método SIA propuesto adecuado.

b. Muestras de degradación por hongos.

Las muestras fueron obtenidas de un estudio en colaboración con la Facultad de Salud Pública de San Pablo-Brasil (Faculdade de Saúde Pública de São Paulo). Nuestros colegas buscan en ese estudio destruir herbicidas como el Paraquat y el Diquat, utilizando hongos. Según el estudio fue mostrando hongos seleccionados segregan sustancias que interaccionan con los herbicidas mencionados permitiendo que sirvan de alimento. En este trabajo se preparó un medio de cultivo con hongo y/o glucosa, inoculado con Paraquat, según un estándar de ensayos preestablecido pre-establecido por nuestros colegas en solución acuosa.

Varias fueron las pruebas realizadas por los investigadores de la Facultad de Salud Pública a lo largo de 30 días que duró el ensayo. La determinación de los herbicidas Paraquat y Diquat fue nuestro aporte a la investigación, en el presente trabajo solo se muestra la determinación de Paraquat. Puesto que nuestros colegas trabajaron con herbicidas comerciales para simular las condiciones encontradas en las tierras de cultivo y no contaban con los estándares necesarios en el que hacer analítico nuestra colaboración fue importante.

Las muestras suministradas no presentaban coloración, y el pH se encontró alrededor de 8. Las concentraciones utilizadas en los ensayos fueron elevadas por lo que se realizó una dilución, se tomo 500 μ L y se llevo a una fiola de 10 mililitros procediendo a completar el volumen con la solución tampón.

Los resultados obtenidos se presentan de manera simplificada en la tabla 9.

Paraquat									
Identificación	Absorbancia			Concentración (mg/L)			Promedio (mg/L)	Desviación Estándar	Composición de la muestra
T6	0.294	0.297	0.300	104.23	105.33	106.42	105.33	1.09	PQ
T5	0.259	0.256	0.259	92.20	91.11	92.20	91.84	0.63	PQ+Gli
T2a	0.234	0.231	0.234	83.46	82.36	83.46	83.09	0.63	PQ+Fungo
T2b	0.619	0.622	0.625	65.39	65.72	66.05	65.72	0.33	PQ+Fungo
T2c	0.559	0.559	0.553	59.16	59.16	58.50	58.94	0.38	PQ+Fungo
T1	0.263	0.263	0.259	93.30	93.30	92.20	92.93	0.63	PQ+Fungo+Gli

Tabla. 9 Datos obtenidos para las muestras analizadas.

Con estos resultados se puede construir un grafico de barras para ilustrar lo que mostraron nuestros análisis para las muestras proporcionadas (Fig. 39).

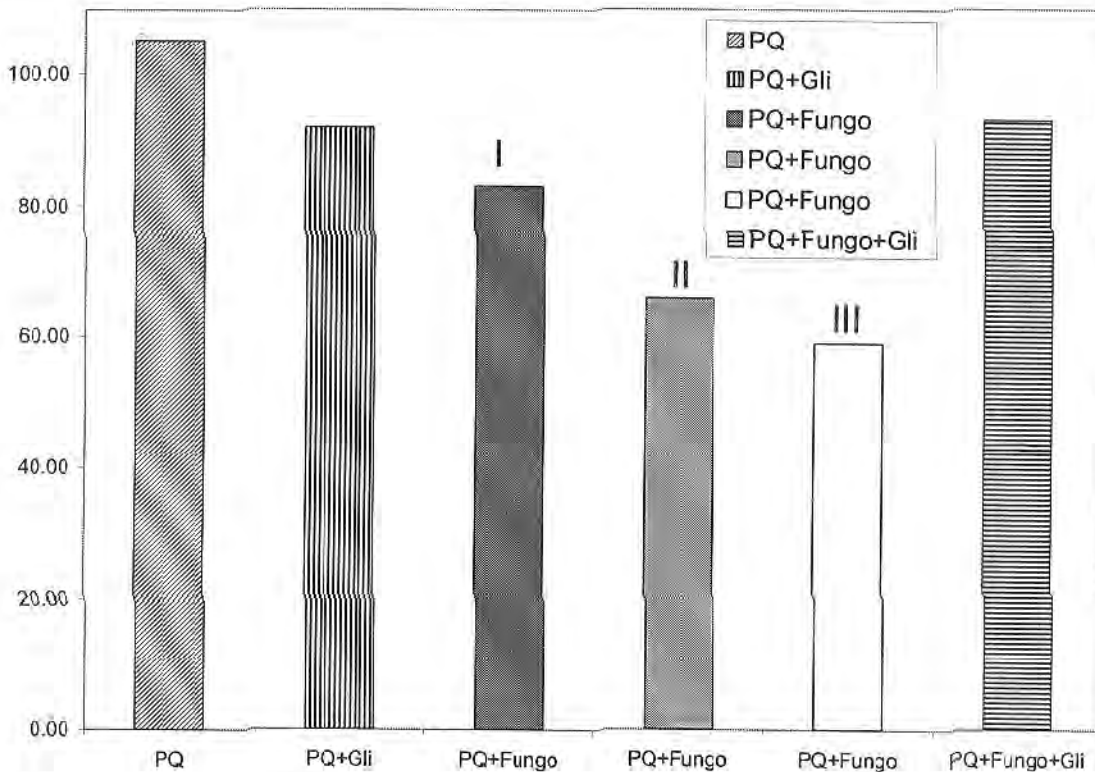


Figura 39. Resultados obtenidos en el caso del Paraquat, concentración en mg/L, en la forma de $C_{12}H_{14}N_2Cl_2$ en condiciones, Longitud de onda = 605nm, $Na_2S_2O_4$ 0.1%(m/v), Solución transportadora: Tampón Borato 0,05M pH=9, Volumen de muestra 300 μ L, caudal de flujo 75 μ L/seg. Camino analítico 50cm. Concentración en mg/L de Paraquat. "Fungo" representa el tipo de hongo utilizado, y "Gli" el tipo de medio, ambas informaciones se mantienen en reserva. Instrumento, espectrofotómetro Micronal B382.

Puesto que los resultados obtenidos son parte de un trabajo todavía en desarrollo que pasaran a formar parte de una tesis de maestría de uno de nuestros colegas los datos se ilustran pero no se discuten en detalle.

Indicaremos que se presenta degradación en el caso del herbicida Paraquat, sin embargo, es pequeña.

Estos resultados se encuentran dentro de lo esperado por nuestros colegas en la Faculdade de Saúde publica de São Paulo, que continúan estudiando la degradación por hongos, tanto del Paraquat como del Diquat, con el objetivo de aplicar en tierras de cultivo contaminadas esta metodología de remediación.

VII. CONCLUSIONES

“Toda vez que usted parte de alguna cosa, alguna otra debe ser hecha primero”

Murphy

VII. CONCLUSIONES

Se desarrollo el método analítico en flujo, basado en análisis por inyección secuencial (SIA), utilizando detección espectrofotométrica, para la determinación del herbicida Paraquat, se escogió la longitud de onda de trabajo, optimizando las variables: Volumen de muestra, Longitud del camino analítico, caudal de flujo, y estudiando, la Influencia de la solución transportadora en la señal, la eficiencia en la mixtura de muestra y reactivo (estudio de interpenetración de zonas), la Influencia del "stopped flow" en la señal de detección y estudiando el coeficiente de dispersión D.

Se aplico el método propuesto en muestras de formulaciones comerciales y el medio de cultivo de hongos(trabajo en colaboración cuyo objetivo es destruir al herbicida), obteniendo resultados aceptables.

Se dejan sentadas las bases para el desarrollo de las metodologías basadas en análisis por inyección secuencial (SIA), y diversas metodologías en flujo.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

“Hay dos cosas infinitas: el Universo y la estupidez humana.”

Albert Einstein

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Chantal Bismuth and Alan H. Hall, Paraquat Poisoning, mecanismo, prevención, tratamiento, *Marcel Dekker Inc.* New York, USA. 1995.
2. L. Michaelis, *Biochemistry*, 2 (1932)250,264.
3. Robert Patrick Mahoney, Paul A. Fretwell, Samuel H. Demirdji, R.L. Mauldin, Olester Benson, Jr., and Tad H. Koch, *J. Anal. Chem. Soc.*, 114(1992) 186-193.
4. International Programme On Chemical Safety, Environmental Health Criteria 39, Paraquat And Diquat, 1984, <http://www.inchem.org>
5. Gy. Matolcsy, M Náclasy, K. Andriska, *studies in enviromental science* 32, Pesticides Chemistry, Elsevier, pag 754-755.
6. J. S. Bus, S. D. Aust, and J. E. Gibson, *Biochem. Biophys. Res. Commnu.*, 58 (1974) 749.
7. Kimbrough, R. D. And Gaines, T. B., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, New York, 14(1970) 679-690.
8. G. Blair, SENASA, comunicación personal.
9. K. Shimizu , K. Ohtaki , K. Matsubara , K. Aoyama , T. Uezono , E. Saito, M. Suno, Ogawa , N. Hayase , K. Kimura , H. Shiono, *Brain Research* 906 (2001) 135-142.
10. Salomón Helfgott, *Uso de Herbicidas en el Perú*, UNESP, Brasil, 27 de octubre 1997, FAO.
11. A. J. Cannard and W. J. Criddle, *Analyst* 100 (1975) 848.
12. G. H. Draffan, R. Clare, D. L. Davis, G. Hawksworth, S Murray and D. S. Davis, *J. Chromatogr.*, 139 (1977) 311.

13. C. Paschal, L. L. Needham, Z. J. Robleu and J. LA. Liddle, *J. Chromatogr.*, 85 (1979) 177.
14. L. Núñez, Y. Moyano, L. Puignou, M.T. Galceran, *J. Chromatogr. LA*, 912 (1979) 353-361.
15. P. Yáñez, J. Pingarron and L. Polo, *Mikrochim. Acta.*, III (1985) 279.
16. J. Moody, R. K. Owusu and J. D. R. Thomas, *Analyst* 113 (1988) 65.
17. Y. Mallat, C. Barzer, R. Abuknesha, G. Gauglitz, D. Barceló *Anal. Chim. Acta* 427 (2001) 165-171.
18. A. Calderbank, C. B. Morgan and S. H. Yuen, *Analyst* 86 (1961) 569-579
19. A. Calderbank, and S. H. Yuen, *Analyst* 90 (1965) 99-106
20. S. H. Yuen, J. Y. Bagness and D Myles, *Analyst* 92 (1967) 375-381
21. Y. Chico Guijarro, P Yañez-Sedeño and L.M. Polo Diez, *Anal. Chim. Acta* 199 (1987) 203-208
22. T. Pérez-Ruiz, C. Martínez-Lozano and V. Tomás, *Anal. Chim. Acta* 224(1991) 99-104.
23. Manuel Agudo, Angel Ríos and Miguel Valcárcel, *Anal. Chim. Acta* 281 (1993) 103-109.
24. T. Pérez-Ruiz, C. Martínez-Lozano and V. Tomás, *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* 44 (1991) 243-252.
25. American Public Health Association, Paraquat, EPA-1, 1982, pag. 1-2.
26. Official and standardized Methods of Analysis of the Royal Society of Chemistry, 3ra Edición, Cambridge-UK, 1994, pag. 563.
27. Standard Methods for the examination of Water and Waste-water, Washington, Paraquat, 1987, Pag. 563.

28. Douglas A. Skoog, Donald M. West, *Análisis Instrumental*, 2da edición, Mc. Graw Hill, México, 1989, 179-
29. J. Ruzicka and H. Hansen, *Flow injection analysis*, 2da edición, Jhon Wiley and Sons, New York, 1988.
30. J. Ruzicka and G. Marshall, *Anal. Chim. Acta* 237 (1990) 329-343.
31. J. Ruzicka and Y. H. C, *Anal. Chim. Acta* 78 (1975)145.
32. Z. Fang, *Flow Injection Separation and Preconcentration*, VCH Publishers, Weinhein (Federal Republic of Germany), 1993.
33. Den Boef and R. C. Schothorst, *Anal. Chim. Acta*, 180 (1986) 1.
34. Den Boef, *Anal. Chim. Acta*, 216 (1989) 289.
35. H. Hansen, *Anal. Chim. Acta*, 261 (1992) 125.
36. Ruzicka and G. D. Marshall, *Anal. Chim. Acta*, 237 (1990) 329.
37. B. Kalberg and G.E. Pacey *Flow injection análisis*, Elseirver, 1989.
38. P. J. Baxter, G. D. Christian, J. Ruzicka, *Analyst*, 119 (1994) 1807.
39. C. Masini, P. J. Baxter, K. R. Dertwiller, and G. D. Christian, *Analyst*, 120 (1995) 1583.
40. Lukkori, J. Ruzicka and G. D. Christian, *Frezenius J. Anal. Chem.*, 346(1993) 8113.