

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
DEPARTAMENTO DE QUIMICA ANALITICA



**DESARROLLO DE ELECTRODOS COMPOSITOS DE
BASE GRAFITO COMO ELECTRODOS
VOLTAMPEROMETRICOS Y DETECTORES
ELECTROQUIMICOS EN FIA Y HPLC**



ARCEIVO

Directores:

José Manuel Pingarrón Carrazón

Angel Julio Reviejo García

CAROLINA FERNANDEZ MARTINEZ
MADRID, 1996



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
DEPARTAMENTO DE QUIMICA ANALITICA

Ciudad Universitaria
28040 Madrid (España)
Teléf. 394 43 31
Fax 394 43 29

**LUIS MARIA POLO DIEZ, CATEDRATICO Y DIRECTOR DE ESTE
DEPARTAMENTO**

CERTIFICA:

Que el presente trabajo, titulado "*Desarrollo de electrodos compósitos de base grafito como electrodos voltamperométricos y detectores electroquímicos en FIA Y HPLC*" ha sido realizado en este departamento por Dña. Carolina Fernández Martínez, bajo la dirección de los doctores D. José Manuel Pingarrón Carrazón, Catedrático de este Departamento y D. Angel Julio Reviejo García, Profesor Titular de este Departamento, constituyendo la Tesis Doctoral de su autora.

Madrid, Junio 1996

Luis M. Polo Díez

A mi familia

A Alfredo

Lo primero que debe hacerse cuando se presenta una Memoria que contiene varios años de trabajo es reconocer que entre sus páginas se esconde la colaboración de muchas personas a muy diferentes niveles.

Están los que te marcan el camino a seguir y te hacen completar, avanzar o rectificar en tu investigación, es decir los directores.

Están los que te enseñan a buscar en la bibliografía, a preparar un electrodo, a manejar un instrumento, un artilugio o un programa de ordenador.

Están los que manejan los mismos equipos o dispositivos que tú, y por eso comparten tus problemas y comprenden perfectamente tus momentos de desesperación.

Están los que te prestan un reactivo, un matraz, un tubo de teflón o un simple tornillo que te saca de apuros en un momento determinado.

Y están todos los demás, los que te soportan diariamente, tanto en la Facultad como en casa, y te animan a seguir adelante.

Por eso, quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todos ellos, y en especial:

A Jose y a Julio, por su dirección y su amistad.

A Asun y a Araceli, mis primeras compañeras de Laboratorio, por su colaboración para lo que hiciera falta, incluso tomar unas cañas si era necesario.

A Lourdes y a Miguel Angel, también liados con sus Tesis Doctorales.

A Ana y a César, que también se pelearon con los electrodos de grafito-teflón.

A Paloma, a quien debo mis primeros pinitos en el FIA en una tesina que ella dirigió.

A Rocío y a Jesús, compañeros de tardes, coche y cañas.

A Javier, a Concha, a María, a Nines, a todos los hacen ahora sus Tesis o Tesinas:
Nuria, Gemma, Teresa, Carlos, Luis, Mohammed, Toñi, ...

A Jose Luis y a Federico, por su ayuda quimiométrica. A Polo por su apoyo cromatográfico.

A los del laboratorio de Orgánica de al lado, por sus frecuentes "prestaciones", en especial a Santi.

Muy especialmente a Alfredo, que, aunque fuera del laboratorio, no ha tenido más remedio que seguir muy de cerca toda la Tesis. También a mi madre, por cuidarme siempre para que no me faltara de nada cuando llegaba a casa. Y a mi padre, que fue el que siempre quiso que yo estudiara y nunca me lo dijo.

GRACIAS, a todos.

Por otro lado, tengo que agradecer a la C.I.C.Y.T. (Proyecto de Investigación ALI 95-047) la financiación de los trabajos recogidos en esta Memoria.

En memoria de mi padre

INDICE

I.- INTRODUCCION	1
I.1.- OBJETIVO Y PLAN DE TRABAJO	3
I.2.- ELECTRODOS COMPOSITOS	6
I.2.1.- Clasificación y generalidades	6
I.2.2.- Electrodos compósitos de pasta de carbono	10
I.2.2.1.- Electrodos de pasta de carbono modificados con mediadores redox	16
I.2.3.- Electrodos compósitos de grafito-teflón	25
I.3.- ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS SOBRE LA DETERMINACION DE TIRAM Y DISULFIRAM	28
I.3.1.- Métodos cromatográficos	29
I.3.2.- Métodos espectrofotométricos	36
I.3.3.- Métodos electroquímicos	40
I.3.4.- Métodos volumétricos	40
 II.- PARTE EXPERIMENTAL	 43
II.1.- DETERMINACION DE TIRAM Y DISULFIRAM CON UN ELECTRODO DE PASTA DE CARBONO MODIFICADO CON FTALOCIANINA DE COBALTO	45
II.1.1.- Instrumentación	45
II.1.1.1.- Aparatos	45
II.1.1.2.- Electrodos y células de trabajo	46
II.1.2.- Reactivos	46
II.1.3.- Procedimientos experimentales	47
II.1.3.1.- Preparación del electrodo modificado	47

II.3.1.1.- Aparatos	57
II.3.1.2.- Electrodos	59
II.3.2.- Reactivos	59
II.3.3.- Procedimientos experimentales	59
II.3.3.1.- Preparación del electrodo compósito de grafito-teflón	59
II.3.3.2.- Pretratamiento del electrodo compósito de grafito-teflón	60
II.3.3.3.- Preparación de disoluciones	60
II.3.3.4.- Medidas por inyección en flujo con detección amperométrica	61
II.3.3.5.- Determinación de tiram en aguas contaminadas	61
II.3.3.6.- Preconcentración por adsorción en continuo	61
II.3.3.7.- Separación en continuo de tiram y disulfiram	62
II.4.- DETECCION ELECTROQUIMICA EN HPLC CON UN ELECTRODO DE GRAFITO-TEFLON. DETERMINACION DE TIRAM Y DISULFIRAM	63
II.4.1.- Instrumentación	63
II.4.1.1.- Aparatos	63
II.4.1.2.- Electrodo y células de trabajo	64
II.4.2.- Reactivos	65
II.4.3.- Procedimientos experimentales	65
II.4.3.1.- Preparación de disoluciones	65
II.4.3.2.- Obtención de los cromatogramas	66
II.4.3.3.- Determinación de tiram en muestras de manzanas contaminadas	66

III.- RESULTADOS Y DISCUSION	69
III.1.- DETERMINACION VOLTAMPEROMETRICA DE TIRAM Y DISULFIRAM CON UN ELECTRODO DE PASTA DE CARBONO MODIFICADO CON FTALOCIANINA DE COBALTO	71
III.1.1.- Elección de la ftalocianina metálica como mediador redox	72
III.1.2.- Comportamiento voltamperométrico y optimización de las condiciones experimentales mediante voltamperometría diferencial de impulsos	74
III.1.2.1.- Influencia de la proporción del modificador	74
III.1.2.2.- Efecto del pH	82
III.1.3.- Características de los procesos de oxidación	87
III.1.4.- Adsorción de los fungicidas sobre el electrodo de pasta de carbono modificado	93
III.1.4.1.- Comportamiento voltamperométrico mediante diferencial de impulsos	97
III.1.4.1.1.- Efecto del tiempo de acumulación	98
III.1.4.1.2.- Influencia del pH	102
III.1.4.1.3.- Efecto del contenido en metanol de la disolución analítica	108
III.1.4.1.4.- Conclusiones parciales	108
III.1.4.2.- Efecto de la velocidad de barrido de potencial mediante voltamperometría de barrido lineal	112
III.1.5.- Curvas de calibrado y características analíticas	117
III.1.6.- Estudio de interferencias	124
III.1.7.- Determinación de tiram en muestras de fresas contaminadas	128

III.2.- DETERMINACION DE TIRAM MEDIANTE INYECCION EN FLUJO CON DETECCION AMPEROMETRICA DE IMPULSOS SOBRE UN ELECTRODO DE PASTA DE CARBONO MODIFICADO CON FTALOCIANINA DE COBALTO	131
III.2.1.- Detección amperométrica convencional sobre el electrodo modificado	131
III.2.2.- Detección amperométrica de impulsos	132
III.2.2.1.- Selección de los valores del potencial aplicados en el programa de impulsos	133
III.2.2.2.- Selección de los valores de tiempo de aplicación de los potenciales anteriores	137
III.2.2.3.- Optimización de las variables hidrodinámicas	138
III.2.2.4.- Curvas de calibrado	143
III.3.- EVALUACION CUANTITATIVA DE TIRAM Y DISULFIRAM MEDIANTE TECNICAS QUIMIOMETRICAS MULTIVARIANTES	148
III.3.1.- Regresión mediante componentes principales (PCR) y mínimos cuadrados parciales (PLSR)	148
III.3.1.1.- Descripción de los modelos matemáticos empleados	150
III.3.2.- Redes neuronales	153
III.3.3.- Desarrollo del método	159
III.3.3.1.- Diseño experimental	160
III.3.3.2.- Regresión mediante PCR y PLSR	162
III.3.3.3.- Aplicación de redes neuronales mediante propagación hacia atrás	167
III.3.3.3.1.- Especificaciones de las redes utilizadas	168
III.3.3.3.2.- Resultados	169

III.4.- DESARROLLO DE ELECTRODOS COMPOSITOS DE GRAFITO-POLI(TETRAFLUOROETILENO) - TEFLON- DETERMINACION VOLTAMPEROMETRICA DE TIRAM Y DISULFIRAM	175
III.4.1.- Comportamiento voltamperométrico mediante barrido lineal	175
III.4.2.- Adsorción de los fungicidas sobre el electrodo compósito	177
III.4.2.1.- Optimización de la composición del electrodo	179
III.4.2.2.- Regeneración electroquímica de la superficie electródica	182
III.4.2.3.- Comportamiento voltamperométrico mediante barrido lineal	184
III.4.2.3.1.- Efecto del pH	186
III.4.2.3.2.- Influencia del tiempo de acumulación	189
III.4.2.3.3.- Efecto de la velocidad de barrido de potencial	195
III.4.2.4.- Curvas de calibrado y características analíticas	201
III.4.2.5.- Estudio de interferencias	205
III.4.2.6.- Determinación de tiram en muestras de fresas contaminadas	211
III.5.- ELECTRODOS DE GRAFITO-TEFLON COMO DETECTORES ELECTROQUIMICOS EN SISTEMAS EN FLUJO	214
III.5.1.- Determinación de tiram y disulfiram mediante inyección en flujo con detección amperométrica	215
III.5.1.1.- Elección del potencial aplicado	215
III.5.1.2.- Repetibilidad de las señales obtenidas	216
III.5.1.3.- Optimización de las variables hidrodinámicas	218
III.5.1.4.- Curvas de calibrado y características analíticas	226

III.5.1.5.- Estudio de interferencias	231
III.5.1.6.- Determinación de tiram en agua de grifo y agua de pozo	235
III.5.1.7.- Preconcentración por adsorción en disoluciones en flujo de los fungicidas	237
III.5.1.7.1.- Repetibilidad de los voltamperogramas . . .	237
III.5.1.7.2.- Influencia del caudal	239
III.5.1.7.3.- Influencia del tiempo de paso de las disoluciones de los fungicidas	242
III.5.1.7.4.- Curvas de calibrado	244
III.5.1.7.5.- Estudio de interferencias	247
III.5.1.8.- Separación en continuo mediante inyección en flujo de tiram y disulfiram	249
III.5.1.8.1.- Elección de la fase móvil y optimización de las variables hidrodinámicas	250
III.5.1.8.2.- Curvas de calibrado	252
III.5.2.- Determinación de tiram y disulfiram mediante HPLC con detección amperométrica	254
III.5.2.1.- Elección de la fase móvil	254
III.5.2.2.- Influencia del potencial aplicado	256
III.5.2.3.- Comparación de la respuesta del electrodo compósito de grafito-teflón con un electrodo de carbono vitrificado	257
III.5.2.4.- Separación de tiram, disulfiram, ziram y fenol . . .	259
III.5.2.5.- Curvas de calibrado. Comparación de las configuraciones wall-jet y thin-layer	265
III.5.2.6.- Determinación de tiram en manzanas contaminadas	266

IV.- CONCLUSIONES 271

V.- BIBLIOGRAFIA 281

I.- INTRODUCCION



L1.- OBJETIVO Y PLAN DE TRABAJO

Una parte esencial de cualquier sistema analítico de medida es el denominado transductor, un dispositivo que convierte el proceso físico/químico de interés en una respuesta adecuada con fines analíticos y que suele ser una señal eléctrica. En espectroscopia puede ser un tubo fotomultiplicador (o un sistema de diodos en serie) que convierte la intensidad de radiación en una corriente (o carga). En análisis térmico puede ser un termopar, que transforma una diferencia de temperatura en una diferencia de potencial. En electroanálisis es el electrodo, más concretamente el electrodo indicador, el cual convierte los procesos acoplados de transferencia de carga interfacial y de transferencia de masa en una corriente eléctrica en las técnicas voltamperométricas. A diferencia de la mayoría de los transductores, puede operar en sentido inverso; es decir, se puede imponer un flujo de corriente a través del electrodo de trabajo y emplearlo para controlar procesos de transferencia electrónica y/o de transferencia de masa, como sucede en coulombimetría, siendo posible además, la medida del potencial en la interfase electrodo-disolución durante el proceso.

Muchos de los avances más significativos que se han producido en Química Analítica en los últimos tiempos, han sido como consecuencia del perfeccionamiento de estos transductores en términos de sensibilidad, selectividad (o por el contrario, carácter universal), operatividad o economía. En Electroanálisis, este problema puede enfocarse hacia el desarrollo de nuevos electrodos indicadores.

Hasta hace pocos años, el desarrollo del análisis voltamperométrico estaba limitado por los materiales electródicos disponibles, dado que sólo era posible utilizar el electrodo de gotas de mercurio, un metal o el electrodo de carbono. El electrodo de pasta de carbono significa el comienzo de una nueva era en electroanálisis, y puede considerarse el punto de partida para la investigación en el área de los electrodos modificados, nuevos materiales compósitos y microelectrodos. En algunos casos, estas tres áreas de investigación resultan indistinguibles; por

ejemplo, ciertos materiales compósitos se comportan como un conjunto de microelectrodos modificados superficialmente.

Con la modificación de la superficie del electrodo se pretende ejercer un mayor control sobre sus características e influir no sólo en el potencial aplicado sino también en la reactividad superficial, pudiendo preseleccionar o anticipar la respuesta del electrodo modificado hacia ciertas especies externas.

Con el desarrollo de nuevos materiales compósitos se pretende precisamente disponer de matrices electródicas susceptibles de ser modificadas de forma homogénea, pero de mayor resistencia mecánica y química que la pasta de carbono y de fácil regeneración de su superficie activa por relleno o pulido.

El objetivo fundamental de este trabajo, enmarcado dentro de una de las líneas de investigación del Grupo de Química Electroanalítica de este Departamento, es el de desarrollar distintos tipos de electrodos que puedan ser aplicados ventajosamente al análisis de compuestos orgánicos de interés ambiental, tanto en discontinuo como en sistemas en flujo.

Los analitos escogidos para estos estudios han sido dos fungicidas derivados del ácido ditiocarbámico: tiram y disulfiram, de comportamiento electroquímico similar y que presentan elevados sobrepotenciales para su oxidación sobre electrodos convencionales [1].

Por una parte, se desarrollará un electrodo de pasta de carbono modificado con un mediador redox, con objeto de facilitar la transferencia de carga entre el electrodo y el analito en disolución. Es posible así, realizar la determinación de los fungicidas a potenciales mucho menos positivos, aspecto éste particularmente interesante cuando se considera su aplicabilidad a la detección electroquímica en sistemas en flujo, ya que la reducción del sobrepotencial de activación permite una

mejora de la selectividad gracias al empleo de potenciales de trabajo más bajos. Se empleará, por tanto, el electrodo modificado para la determinación de tiram y disulfiram en discontinuo y se investigará la posibilidad de su utilización como detector amperométrico en continuo. Por otro lado, se discutirá la aplicación de diversas técnicas quimiométricas para la determinación conjunta de estos dos fungicidas de comportamiento electroquímico tan similar.

Por otra parte, se desarrollará y caracterizará un electrodo compuesto de grafito y teflón (poli-tetrafluoroetileno), con el fin de aprovechar las propiedades que ofrecen este tipo de materiales compósitos con respecto a los electrodos convencionales en términos de relación señal-ruido y con respecto a los electrodos de pasta de carbono en términos de resistencia mecánica y química. Se estudiará el comportamiento del electrodo compuesto de grafito-teflón tanto en discontinuo como en continuo, empleando como analitos tiram y disulfiram. La adsorción de estos compuestos sobre el electrodo constituye la base para su determinación en discontinuo y se aprovechará para desarrollar un método de preconcentración selectiva en continuo. Por último, se demostrará la utilidad del electrodo compuesto desarrollado como detector en sistemas en flujo, tanto FIA como HPLC, especialmente en este último caso donde no son útiles los electrodos de pasta de carbono puesto que el portador puede contener porcentajes elevados de disolventes orgánicos. Así, se determinarán conjuntamente tiram y disulfiram tras su separación mediante cromatografía líquida de fase inversa, empleando como detector amperométrico el electrodo de grafito y teflón.

L2.- ELECTRODOS COMPOSITOS

L2.1.- CLASIFICACION Y GENERALIDADES

Un electrodo compuesto puede definirse como un material que consta de al menos una fase conductora en conjunción con al menos una fase aislante, siendo el caso más usual un material que contiene una fase conductora y una fase aislante.

Los electrodos compósitos ofrecen muchas ventajas potenciales en comparación con los electrodos más tradicionales consistentes en una fase conductora simple. Por ejemplo, los electrodos compósitos pueden a menudo fabricarse con gran flexibilidad en cuanto al tamaño y forma del material, permitiendo una fácil adaptación a una gran variedad de configuraciones electrónicas. Los electrodos compósitos de metales preciosos ofrecen ventajas en forma de un menor peso y de un menor coste en comparación con los correspondientes electrodos conductores puros. Una ventaja particular en electroanálisis es la mayor relación señal/ruido que a menudo se observa con los electrodos compósitos (con relación al correspondiente electrodo conductor puro), lo que generalmente se traduce en mejores (menores) límites de detección. Quizás el aspecto más interesante de los electrodos compósitos es la versatilidad que permiten para incorporar especies que intensifiquen la selectividad y/o la sensibilidad en el propio material electrónico, bien mediante modificación química del conductor y/o del aislante antes de la fabricación del compuesto, o mediante incorporación física dentro de la matriz del compuesto. A diferencia de los electrodos modificados superficialmente, estos electrodos compósitos modificados pueden ser regenerados en su superficie sin pérdida de modificador.

Los electrodos compósitos se pueden clasificar según el modo en el que el conductor y el aislante están distribuidos dentro del material compuesto. En la Figura 1 se ilustra dicha clasificación.

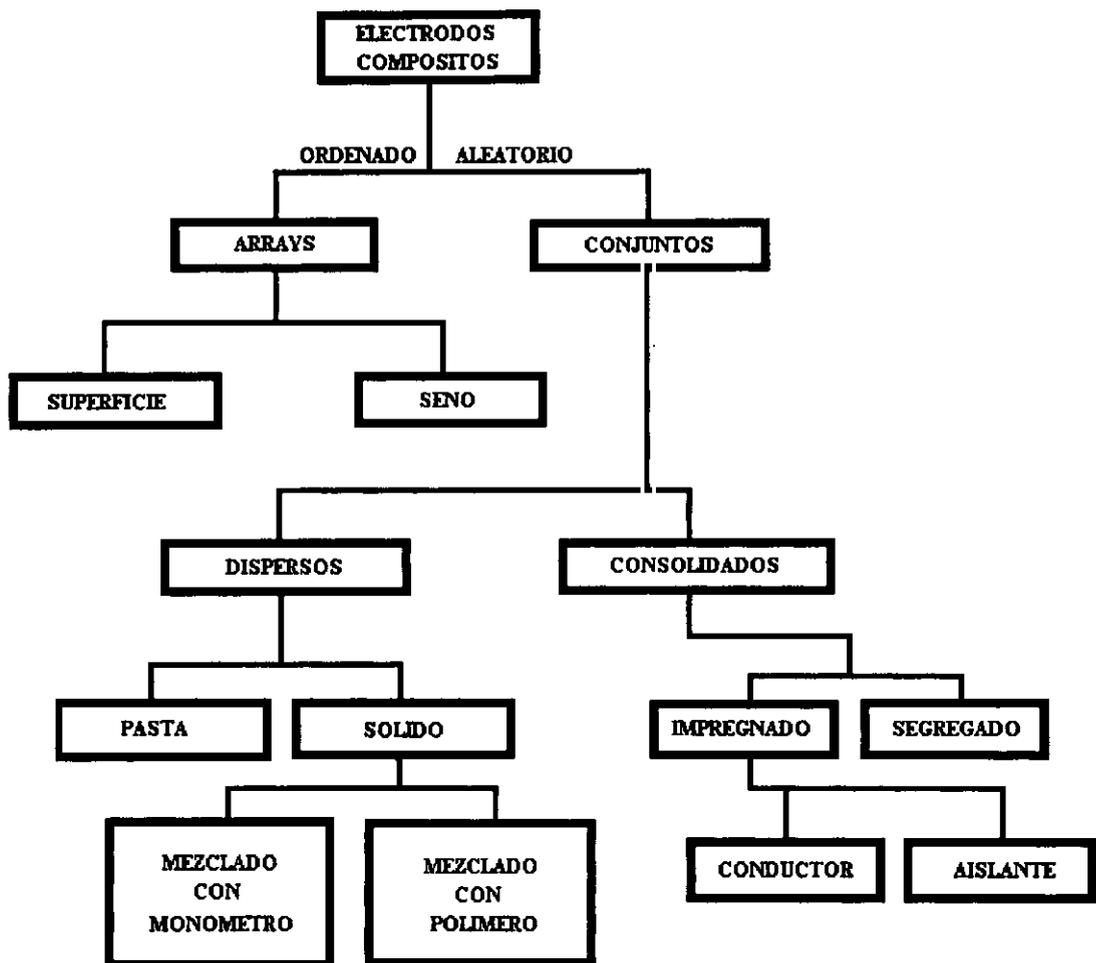


Figura 1

Clasificación de los electrodos compósitos

Puesto que, por definición, un electrodo compósito consiste en al menos una fase conductora y al menos una fase aislante entremezcladas de alguna manera, la superficie del electrodo compósito en contacto con la disolución consiste necesariamente en regiones de conductor separadas por regiones de aislante. La primera clasificación está basada en si la disposición del conductor y del aislante está altamente ordenada (un array) o es aleatoria (un conjunto).

Los electrodos de array pueden clasificarse posteriormente dependiendo de si el conductor está confinado en la superficie de un aislador (o de un aislante en la superficie de un conductor) o el conductor ordenado penetra en el seno del material. La mayoría de los electrodos de array utilizados en Electroanálisis son superficiales y pueden encontrarse algunos ejemplos en la revisión de Tallman y Petersen [2]. Estos arrays tienen geometrías bien definidas pero, sin embargo, sus superficies a menudo no son planas y pueden ser también bastante delicadas de pulir, requiriéndose otra forma de regeneración superficial.

Por lo que se refiere a los electrodos compósitos de conjunto, estos se pueden clasificar dependiendo de la distribución del conductor a través de la matriz del compósito. Los materiales en los que las partículas de conductor están distribuidas aleatoriamente por todo el aislante se denominan compósitos dispersos. Una partícula de conductor (o un agregado de partículas) tiene una probabilidad idéntica de ocupar cualquier punto en la matriz. En contraste, los compósitos consolidados están formados de tal manera que el conductor se extiende a través del compósito de un modo reticulado, aleatorio, con regiones de aislante puro y de conductor puro que no están entremezcladas.

Los compósitos dispersos pueden fabricarse en forma de pasta o bien sólidos. Dentro del primer grupo pueden incluirse los electrodos de pasta de carbono, que serán tratados en el Apartado I.2.2. Los compósitos dispersos sólidos pueden prepararse de dos formas. El método más común (mezclado con monómeros) implica la dispersión uniforme de un conductor en un monómero que es subsiguientemente polimerizado [2]. Alternativamente, el conductor puede dispersarse en un polímero o una cera fundidos o disueltos (mezclado con polímeros) y permitir que la mezcla se endurezca.

Los compósitos consolidados se pueden fabricar también de dos maneras generales. Una implica la impregnación de, o bien un conductor poroso con un

aislante, o bien de un aislante poroso con un conductor, denominándose tales materiales compósitos impregnados. En este caso la consolidación del conductor dentro del compósito (y por tanto en la superficie del electrodo) está predeterminada por la estructura porosa del conductor o del aislante.

La segunda manera de formar electrodos consolidados implica la mezcla de un conductor en polvo con un polímero en polvo y el moldeado por compresión de la mezcla. Dentro de este grupo se sitúan los electrodos compósitos de grafito y teflón, que serán tratados con más detenimiento en el Apartado I.2.3. Estos materiales se llaman compósitos segregados. Los compósitos consolidados en general y los compósitos segregados en particular presentan frecuentemente ventajas en comparación con los compósitos dispersos en Electroanálisis.

Los electrodos de array y los electrodos compósitos impregnados conducen a través de regiones bastante continuas de conductor mayoritariamente puro y homogéneo. Por otra parte, los electrodos compósitos segregados y los dispersos conducen a través de regiones bastantes discontinuas, altamente heterogéneas de conductor y aislante entremezclados, un proceso descrito a menudo por modelos de percolación [2]. Para tener una conductividad adecuada para su uso en electroanálisis, un material compósito segregado o disperso debe tener una fracción de volumen de conductor, f , algo por encima de la composición crítica o umbral de percolación, f_c . Esta composición crítica es significativamente menor para compósitos segregados que para compósitos dispersos. Para ambos tipos de materiales la mayor fracción de volumen utilizable de conductor está a menudo determinada por la estabilidad mecánica requerida para el material y varía fuertemente con la naturaleza del aislante y del conductor.

La superficie de un electrodo compósito puede asemejarse a un conjunto de microelectrodos. Es este aspecto el que da lugar a las mejoras en la relación

señal/ruido para muchos electrodos compósitos cuando se les compara con sus correspondientes fases conductoras puras.

Un electrodo compósito es capaz de producir una corriente mayor por unidad de área activa que la del correspondiente macroelectrodo conductor puro, tanto en disoluciones quiescentes como bajo condiciones hidrodinámicas. Puesto que el ruido y la corriente de fondo (por unidad de área activa) deben ser similares para ambos tipos de electrodos, el electrodo compósito presumiblemente muestra la mayor relación señal/ruido. A medida que el recubrimiento fraccional de la superficie geométrica del compósito por el conductor aumenta, la relación señal/ruido tiende a disminuir, aproximándose en el límite a la del electrodo conductor puro. Es por esta razón por la que los compósitos consolidados, que poseen buena conductividad a un bajo valor de f , es presumible que muestren una relación señal/ruido superior a la de los compósitos dispersos.

L2.2.- ELECTRODOS COMPOSITOS DE PASTA DE CARBONO

En 1958, Adams publicó un artículo preliminar en el que introducía un nuevo tipo de electrodo sólido de carbono para voltamperometría, al que llamó electrodo de pasta de carbono (CPE) [3]. El electrodo había sido inventado en un intento de preparar un electrodo de carbono renovable, gotero, que pudiese ser utilizado en zonas de potenciales positivos donde los electrodos de mercurio no son aplicables debido a la oxidación del material electródico. Se pensó que esta alternativa al electrodo gotero de mercurio podría ser llevada a la práctica empleando un capilar conectado a un depósito lleno de una suspensión de polvo de grafito en un líquido orgánico apropiado [4]. Sin embargo, tal montaje electródico resultó no tener utilidad práctica, debido aparentemente a un contenido demasiado grande de matriz líquida, que originaba una alta resistencia eléctrica y otros efectos no deseados. No obstante, una mezcla íntima de polvo de carbono o grafito con una cantidad apropiada de un

líquido orgánico no conductor resultó ser un material electródico muy útil, con una consistencia semejante a la de la mantequilla [4].

Las siguientes investigaciones, la mayoría desarrolladas por el grupo de Adams, se encaminaron a la caracterización del electrodo a partir de estudios electroquímicos básicos y, poco después, aparecieron las primeras aplicaciones prácticas de CPEs para determinaciones analíticas [5]. Durante la década de los 60 y principios de los 70 se emplearon extensamente CPEs para el estudio del comportamiento electroquímico de numerosos compuestos orgánicos.

En 1964, Kuwana y colaboradores describieron una nueva forma de investigar el comportamiento electroquímico de algunos compuestos orgánicos disolviéndolos en el componente líquido de la propia pasta [6]. Así, los autores demostraron que la pasta de carbono podía contener otro constituyente, que afectaba de diferente forma al comportamiento global del material electródico. Este método puede considerado como la primera contribución al posterior desarrollo de los electrodos de pasta de carbono modificados químicamente (CMCPEs) en los años 70. Como consecuencia, un nuevo avance que incrementó la popularidad de los CPEs, particularmente como materiales modificados, tuvo lugar con la sustitución del componente líquido de la pasta por un aglutinante electrolítico. Tales materiales similares a la pasta resultaron muy adecuados para el estudio electroquímico de numerosas sustancias, principalmente sólidos inorgánicos que se incorporaron directamente a la pasta [7].

Como cabía esperar a partir de estas investigaciones, inmediatamente después de la primera modificación de un electrodo sólido en 1975 [8], la pasta de carbono comenzó a atraer la atención como un material que puede ser modificado fácilmente. Así, un trabajo pionero en este campo fue realizado por Cheek y Nelson, que introdujeron grupos funcionales complejantes en la superficie del carbono para preconcentrar plata [9]. Yao y Musha escogieron otro método de modificación,

consistente en disolver un modificador en el líquido aglutinante para inmovilizar especies electroactivas [10]. Pero fue, sin lugar a dudas, el trabajo de Ravichandran y Baldwin en 1981, proponiendo la mezcla directa de un modificador con la pasta, el activador de la enorme expansión en las aplicaciones de los electrodos de pasta de carbono modificados que tuvo lugar en los años posteriores [11]. El número de publicaciones aumentó exponencialmente desde entonces. Los CMCPes se emplearon tanto para determinaciones voltamperométricas directas como para determinaciones amperométricas en sistemas continuos o discontinuos. Recientemente se han convertido en un soporte muy atractivo para las modificaciones con enzimas, debido concretamente a la facilidad de modificación de las pastas de carbono sin necesidad de métodos químicos rigurosos. Este es probablemente uno de los campos de investigación más excitantes desarrollados en los últimos años.

La primera revisión dedicada exclusivamente a los CPEs fue escrita por el propio inventor y cubre las experiencias con CPEs en el período 1958-1963 [12]. Desde entonces se han publicado varias revisiones sobre el empleo de CPEs en análisis voltamperométrico o como detectores en sistemas en flujo [13,14]. Cabe destacar la revisión de Kalcher sobre CMCPes que recoge las investigaciones más importantes realizadas hasta 1989 [7]. Las experiencias más modernas y las últimas tendencias en este campo también han sido recopiladas [15,16].

La pasta de carbono es un material compósito disperso, constituido por una mezcla de polvo de grafito y un líquido aglutinante. El tamaño de partícula del grafito oscila entre 5 y 20 μm . Partículas mayores originan una textura rugosa y propiedades mecánicas y electroquímicas desfavorables, mientras que los polvos de grafito de menor tamaño de partícula pueden ser adecuados para la fabricación de microelectrodos de pasta de carbono. El grafito debe poseer una serie de propiedades, tales como una distribución uniforme de tamaño de partícula, gran pureza química y baja capacidad de adsorción para el oxígeno e impurezas

electroactivas. Materiales demasiado porosos como el carbono negro no son apropiados para la preparación de pastas de carbono [4,12].

El segundo componente de la pasta de carbono es el líquido aglutinante. Debe ser químicamente inerte y no electroactivo, insoluble en la disolución a analizar, escasamente volátil y estar libre de impurezas electroactivas.

La pasta de carbono se prepara mezclando íntimamente el polvo de grafito con el líquido aglutinante. La relación aglutinante/polvo de grafito varía entre 0.3 y 0.5 mL por gramo de grafito (pastas "secas") y 0.5 y 0.9 mL por gramo de grafito (pastas "húmedas").

La estructura superficial de la pasta de carbono ha sido estudiada mediante métodos electroquímicos, ópticos y microscópicos, y puede describirse como un conglomerado de zonas conductoras (grafito) y aislantes (aglutinante). El tamaño y abundancia relativa de estas zonas depende de la relación grafito/aglutinante. Los CPEs con una composición normal exhiben una superficie que está prácticamente recubierta por una finísima película del líquido aglutinante. Además de la relación grafito/aglutinante, las propiedades físicas y químicas de ambos componentes determinan el comportamiento electroquímico global de los CPEs.

La compleja naturaleza heterogénea de los CPEs afecta a la transferencia de carga superficial. En general, la presencia del aglutinante en la superficie disminuye la velocidad de la transferencia electrónica (cinéticas más lentas), aumentando el sobrepotencial con respecto a los electrodos homogéneos. Al aumentar la lipofilia del líquido aglutinante se incrementa el sobrepotencial (irreversibilidad) puesto que el carácter hidrofóbico del aglutinante dificulta el acceso de los analitos hidrofílicos a la superficie del electrodo. Este efecto se produce también al aumentar el contenido de aglutinante en la pasta.

Los CPEs muestran corrientes de fondo inferiores comparadas con los electrodos de grafito sólido o metales nobles. La corriente residual disminuye al aumentar la cantidad de aglutinante en la pasta. Sin embargo, este efecto va acompañado de un descenso de la sensibilidad del electrodo.

Los CPEs pueden ser polarizados en una ventana de potencial que abarca aproximadamente de -1.0 a +1.3 V vs. SCE en medio ácido y de -1.5 a +1.0 V vs. SCE en medios neutros y alcalinos. No obstante, en las medidas voltamperométricas realizadas en la zona de potenciales negativos, el oxígeno atrapado en la pasta interfiere seriamente.

Debido a la presencia del aglutinante, la extracción de especies lipofílicas es una propiedad única de los CPEs. La preconcentración vía extracción es ligeramente selectiva; sin embargo, la selectividad puede exaltarse ajustando el pH del medio, ya que solamente las especies neutras o los pares iónicos pueden ser extraídos en la pasta que contiene un aglutinante apolar. Los CPEs también pueden discriminar entre extracción y adsorción, lo que puede ser útil para el análisis de mezclas de sustancias que presentan un comportamiento electroquímico muy similar. La capacidad de adsorción de algunos compuestos, en particular moléculas lipofílicas, sobre los CPEs puede ser mayor que sobre los electrodos sólidos convencionales, de nuevo a causa del aglutinante.

La relación grafito/aglutinante ejerce un efecto importante en el análisis de compuestos orgánicos que se adsorben sobre la superficie del electrodo. Cuanto mayor es el contenido de aglutinante, mayor es la resistencia del electrodo (eléctrica y difusional) y menor la cantidad de partículas de grafito activas (no cubiertas por el aglutinante) en la interfase electrodo-disolución. Variando la cantidad de grafito en relación al aglutinante, es posible distinguir entre fenómenos de adsorción sobre las partículas de grafito y aquellos que ocurren esencialmente por difusión a través de las capas de aglutinante hacia el grafito [17]. A pesar de que es difícil establecer

un modelo [18], parece ser que cualquier curva voltamperométrica registrada sobre el CPE corresponde a fenómenos controlados tanto por adsorción como por difusión de la especie electroactiva en la fase pasta y en la fase disolución (difusión hacia las partículas de grafito en la interfase electródica).

Gracias a la pequeña corriente residual en un amplio intervalo de potencial, ha sido posible la determinación de cantidades muy pequeñas de compuestos orgánicos sobre CPEs empleando voltamperometría de barrido lineal (LSV), diferencial de impulsos (DPV) o de corriente alterna (ACV). Para ciertos tipos de compuestos orgánicos (moléculas lipofílicas) y en determinadas condiciones experimentales (pH, fuerza iónica, temperatura), la pasta de carbono ofrece una gran sensibilidad y selectividad gracias a la preconcentración del analito por adsorción-extracción [19,20].

La acumulación se lleva a cabo controlando con precisión el transporte de masa (agitación constante, control de temperatura) bien a potencial controlado, o bien a circuito abierto. Esta última modalidad es la que suele utilizarse (permite el análisis de pequeños volúmenes de muestra) a pesar de ser algo menos sensible [19]. La determinación de trazas de compuestos orgánicos en matrices complejas requiere bien separación del analito por extracción, o bien dilución y utilización de voltamperometría de adsorción-redisolución (cambio de medio) [18-20].

La heterogeneidad de la pasta de carbono es una desventaja con respecto a las aplicaciones de los CPEs en medios no acuosos puesto que se desintegra el material electródico.

La reproducibilidad de los CPEs es algo peor que la de los electrodos de mercurio, metales nobles o carbono vitrificado. Los valores de la desviación estándar relativa obtenidos a partir de medidas con CPEs oscilan alrededor del 5%. Los

límites de detección para la determinación de sustancias orgánicas e inorgánicas alcanzan valores bastante bajos [7].

1.2.2.1.- Electrodo de pasta de carbono modificados con mediadores redox

La utilización de reacciones electrocatalíticas con fines analíticos ha cobrado gran interés especialmente en los últimos años, debido concretamente a la expansión que ha tenido lugar en el campo de la biosensorización de moléculas biológicamente importantes a través de compuestos electroquímicamente activos.

En general, para la preparación de los electrodos de pasta de carbono modificados suelen utilizarse diversos métodos, algunos de ellos similares a los empleados para modificar otro tipo de electrodos sólidos. En primer lugar podría citarse la adsorción directa del modificador sobre la superficie del CPE, raramente utilizado con este fin puesto que es un sistema más apropiado para preconcentrar especies electroactivas. La formación de enlaces covalentes entre el modificador y el electrodo tampoco suele emplearse puesto que requiere tratamientos complicados como oxidación o silanización. Por otro lado, la disolución del modificador en el líquido aglutinante es aplicable solamente a sustancias con propiedades fuertemente lipofílicas. Sin duda alguna, el método utilizado más comúnmente para preparar electrodos de pasta de carbono modificados es la mezcla directa del modificador con la pasta, sugerido en 1981 por Ravichandran y Baldwin [11]. La mezcla puede hacerse calentando ligeramente la pasta o en presencia de una pequeña cantidad de disolvente orgánico (cloroformo, tetracloruro de carbono) para solubilizar el modificador insoluble en agua y obtener una pasta de composición homogénea. Después de la evaporación del disolvente a temperatura ambiente, la pasta está preparada para su uso. Los modificadores utilizados en mezcla directa deben ser insolubles en la disolución analítica o, al menos, adsorberse fuertemente sobre los

componentes de la pasta de manera que se evite su disolución en la superficie del electrodo durante la medida.

Es necesario renovar la superficie del electrodo si permanecen componentes electroactivos adsorbidos sobre la superficie o si los grupos funcionales del modificador quedan bloqueados. El método empleado para la regeneración de la superficie depende de los mecanismos implicados en el proceso analítico. Siempre es preferible una regeneración química o electroquímica, puesto que así se asegura que el número de grupos funcionales reactivos en la superficie del electrodo permanece constante en una serie de medidas repetidas. No obstante, si se dan procesos de preconcentración química o extracción dentro del electrodo se recomienda la renovación manual de la superficie para evitar riesgos de efectos de memoria. La renovación mecánica requiere una gran homogeneidad del material electródico y un tratamiento totalmente análogo de la superficie del mismo para garantizar resultados reproducibles.

La electrocatálisis en la superficie del electrodo puede tener lugar de varias formas. Frecuentemente se produce catálisis directa, como se esquematiza en la Figura 2. En el caso de la oxidación, el sustrato $A(\text{red})$ es oxidado a $A(\text{ox})$ por la forma oxidada del modificador, $M(\text{ox})$, que pasa a su forma reducida $M(\text{red})$. Este puede ser oxidado de nuevo electroquímicamente. La corriente neta observada corresponde a la concentración de sustrato en el seno de la disolución. La reducción podría describirse con un mecanismo análogo. El modificador actúa claramente como un mediador redox, con objeto de reducir el sobrepotencial de la transformación electroquímica del sustrato. De forma similar puede explotarse la catálisis regenerativa si un analito electroactivo se transforma electroquímicamente en un producto inerte, y éste reacciona con el catalizador para reconvertirse en la especie analítica.

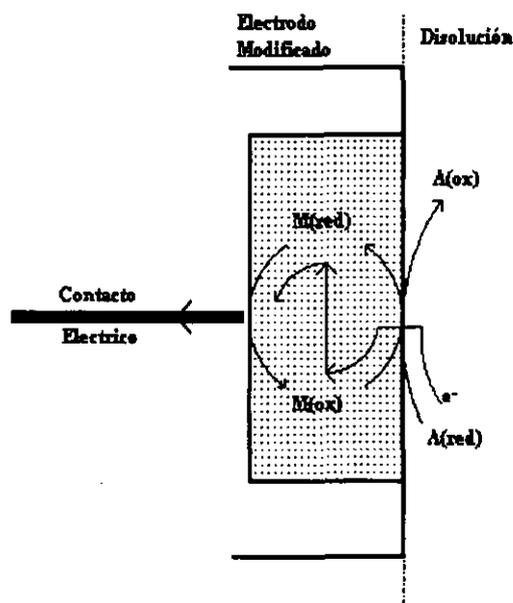


Figura 2

Esquema de la acción directa del mediador redox utilizado como modificador en electrodos de pasta de carbono; M, modificador; A, analito; red: forma reducida; ox: forma oxidada

Entre los analitos inorgánicos determinados con mayor frecuencia sobre electrodos de pasta de carbono modificados con mediadores redox destaca el peróxido de hidrógeno, que aparece frecuentemente como producto de ciertos procesos enzimáticos. Algunos ejemplos concretos pueden encontrarse en una moderna revisión de Kalcher y colaboradores [16].

La actividad electrocatalítica de los electrodos de pasta de carbono modificados cobra una especial importancia cuando se aplica a la determinación de analitos orgánicos, puesto que la mayoría de los compuestos orgánicos de interés presentan un sobrepotencial tan grande para su oxidación o reducción electroquímica, que su determinación sobre electrodos convencionales se hace difícil o incluso imposible.

Los compuestos organometálicos insolubles en agua, tales como las ftalocianinas metálicas que se usarán en este trabajo, son modificadores muy apropiados para la pasta de carbono. Los electrodos resultantes ofrecen propiedades catalíticas que reducen sustancialmente el sobrepotencial de los procesos redox de este tipo de analitos débilmente electroactivos sobre electrodos no modificados.

En la Tabla I se recogen algunas de las aplicaciones más interesantes de los electrodos de pasta de carbono modificados con ftalocianinas metálicas.

El grupo de Baldwin fue uno de los primeros en utilizar electrodos modificados con ftalocianina de cobalto con fines analíticos [21], habiéndose demostrado su utilidad tanto en discontinuo como en sistemas en flujo [22-30]. Wang y col. también han utilizado la ftalocianina de cobalto para catalizar la electrooxidación de hidracina [31] y peróxidos orgánicos [32] y el grupo de Kauffmann profundiza en las aplicaciones concretas de esta ftalocianina para la determinación de compuestos orgánicos que contienen azufre [33,34]. En esta misma línea, aunque tratándose de analitos inorgánicos, puede citarse un método recientemente desarrollado para la determinación en continuo de tiocianato y selenocianato sobre un electrodo de pasta de carbono modificado con CoPC [35].

A pesar de que la mayor parte de las aplicaciones basadas en ftalocianinas metálicas se centran en la ftalocianina de cobalto, nuestro propio Grupo de Investigación ha empleado la ftalocianina de níquel como mediador redox para la determinación de los antioxidantes BHT y BHA [36,37]. También hay que mencionar el empleo de la ftalocianina de hierro como modificador de los CPEs para la reducción catalítica de peróxidos orgánicos [38].

Tabla I

Ejemplos de las aplicaciones de los electrodos de pasta de carbono modificados con ftalocianinas metálicas.

Modificador	Analito	Medio	Potencial	Método	Ref.
CoPC	Hidracina	NaOH 0.2 M	-0.1 V vs. Ag/AgCl	CV, LCED	21
CoPC	Cisteina, glutation	H ₂ SO ₄ 0.5 M o fosfato 0.5 M	-0.8 V vs. Ag/AgCl	CV, LCED	22,23
CoPC	Acido oxálico, α-cetoácidos	fosfato 0.5 M (pH 2)	+0.75 - +0.90 V vs. Ag/AgCl	CV, LCED	24,25
CoPC	Tiopurinas	fosfato 0.1 M	+0.6 V vs. Ag/AgCl	CV, LCED	26
CoPC	Hidratos de carbono	NaOH 0.15 M	+0.4 V vs. Ag/AgCl	CV, LCED (PAD)	27
CoPC	Hidratos de carbono, polialcoholes	NaOH 0.15 M	+0.4 - +0.5 V vs. Ag/AgCl	CV, LCED	28
CoPC	Alditales, azúcares	NaOH 0.15 M	+0.55 V vs. Ag/AgCl	CV, LCED (PAD)	29
CoPC	Ribonucleótidos	NaOH 0.15 M	+0.4 - +0.5 V vs. Ag/AgCl	CV, LCED	30
CoPC	Hidracina	Fosfato 0.1 M	+0.3 V vs. Ag/AgCl	CV	31
CoPC	Peróxidos orgánicos	KNO ₃ 0.05 M	+0.7 V vs. Ag/AgCl	CV, FIA	32
CoPC	Cisteina, compuestos con azufre	H ₂ SO ₄ 0.5 M, fosfato 0.5 M	+0.7 - +0.8 V vs. SCE	LSV	33
CoPC	Tiamazol, tiourea	-	-	-	34

Tabla I (Cont.)

Ejemplos de las aplicaciones de los electrodos de pasta de carbono modificados con ftalocianinas metálicas.

Modificador	Analito	Medio	Potencial	Método	Ref.
CoPC	SCN ⁻ , SeCN ⁻	Britton-Robinson 0.04 M	+0.83, +0.60 V vs. SCE	FIA (PAD)	35
NiPC	BHA	HClO ₄ 0.1 M	+0.50 V vs. SCE	DPV	36
NiPC	BHT	Fosfato 0.05 M (pH 2)	+0.80 V vs. SCE	DPV	37
FePC	Peróxidos orgánicos (reducción)	Fosfato (pH 2)	+0.1 - +0.2 V vs. Ag/AgCl	CV, LCED	38

CV, Voltamperometría cíclica; LCED, Cromatografía líquida con detección electroquímica; FIA, análisis por inyección en flujo; LSV, voltamperometría de barrido lineal; PAD, detección amperométrica de impulsos

Los óxidos de metales de transición constituyen otro grupo de catalizadores bastante empleados como modificadores de los CPEs [39-42]. Los electrodos resultantes se han utilizado preferentemente como detectores electroquímicos en HPLC dada su gran estabilidad, efecto catalítico y densidades de corriente extremadamente elevadas [39]. En la Tabla II se recogen algunas de las aplicaciones más importantes de este tipo de electrodos. Puede destacarse la construcción de un sensor "array" basado en pasta de carbono modificada con óxidos de rutenio, cobre, níquel y cobalto para la determinación en continuo de carbohidratos y aminoácidos [42].

Se ha investigado asimismo la posibilidad de inmovilizar compuestos orgánicos con actividad catalítica en electrodos de pasta de carbono [11,43-45]. En la Tabla III se citan algunos de los modificadores empleados, así como la respuesta de los diversos analitos ensayados.

Tabla II

Aplicaciones de los electrodos de pasta de carbono modificados con óxidos de metales de transición como mediadores redox

Modificador	Analito	Medio	Potencial	Método	Ref.
Cu ₂ O	Hidratos de carbono, aminoácidos, alcoholes, aminas	NaOH 0.1 M	+0.55 V vs. Ag/AgCl	FIA	39
RuO ₂	Alcoholes, hidratos de carbono	NaOH 1.0 M	+0.4 V vs. Ag/AgCl	FIA	40
Oxido de Co(II,III)	H ₂ O ₂	NaOH 0.1 M	+0.4 (ox) o -0.3 V (red) vs. Ag/AgCl	FIA	41
RuO ₂ , Cu ₂ O, NiO y CoO	Hidratos de carbono, aminoácidos	KOH 0.5 M, NaOH 1.0 M	+0.45 V vs. Ag/AgCl	FIA	42

FIA, análisis por inyección en flujo

El empleo de electrodos de pasta de carbono modificados con mediadores redox, como sistemas de detección electroquímica en cromatografía líquida, introducido por el grupo de Baldwin [21], amplía enormemente las posibilidades de detectar y determinar electroquímicamente numerosos analitos que presentan cinéticas de transferencia electrónica lentas [14,46,47]. Además, al trabajar con un potencial aplicado más bajo, se consiguen límites de detección inferiores. La ftalocianina de cobalto es, sin duda, el modificador que con más frecuencia se ha incorporado a la pasta de carbono como mediador redox. Algunas de las aplicaciones de los electrodos resultantes como detectores en sistemas en flujo se hallan recogidas en la Tabla I.

Tabla III

Aplicaciones de los electrodos de pasta de carbono modificados con compuestos orgánicos con actividad catalítica

Modificador	Analito	Medio	Potencial	Método	Ref.
Apomorfina (par redox)	Acido ascórbico	Regulador McIlvaine (pH 6 o 7.4)	+0.3 V vs. SCE	CV	43
Quinonas	Ferrocianuro, NADH y ácido ascórbico	Regulador McIlvaine (pH 7)	-0.1 V vs. SCE (NADH)	CV	11
4,4'-bipiridilo	Citocromo, azurina y ferricianuro (reducción)	NaClO ₄ 0.1 M + fosfato 0.1 M (pH 7)	+0.236, +0.312 y +0.468 V vs. SSCE (E ₀)	CV	44
N,N,N',N'- tetrametil-p- fenilendia- mina	Acido ascórbico y NADH	Na ₂ HPO ₄ 0.15 M o ácido cítrico 0.15 M	+0.1 y +0.4 V vs. SCE	CV, CA	45

CV, Voltamperometría cíclica; CA, Cronoamperometría

Los electrodos de pasta de carbono comenzaron a utilizarse como detectores amperométricos en sistemas en flujo a principios de los 70 [48]. La preparación es sumamente sencilla, ya que basta con rellenar con la pasta el hueco de una célula wall-jet o thin-layer a la que se le ha quitado el electrodo de disco para disponer de un detector rápido y sensible. Las excelentes características de los detectores de pasta de carbono en términos de relación señal/ruido se atribuyen a la naturaleza compósita de su superficie y permiten la obtención de límites de detección dos o tres órdenes de magnitud más pequeños que los obtenidos habitualmente sobre un detector de carbono vitrificado. Sin embargo, si se imponen potenciales negativos a un CPE para detectar reducciones, la presencia de oxígeno en la pasta origina una corriente residual muy grande y, como consecuencia, no se obtienen buenos límites de detección.

Normalmente, los detectores de pasta de carbono mantienen un buen funcionamiento durante varios días sin necesidad de renovar la superficie, dependiendo del potencial aplicado, el tipo de muestras inyectadas y la naturaleza del portador o la fase móvil. Sin embargo, en algunos trabajos se comenta la falta de estabilidad en volumen (hinchamiento por hidratación) de los electrodos de pasta de carbono cuando se emplean en sistemas en flujo [49,50] o la pérdida de grupos activos (CoPC) de la superficie como consecuencia de las violentas condiciones hidrodinámicas ("leaching") [22,51]. De cualquier forma, el principal problema y en el que coinciden la mayoría de los autores que han trabajado con detectores de pasta de carbono, es su incompatibilidad con disolventes orgánicos, que origina una fuerte deriva de la línea base. Si se emplean fases móviles con más de un 20% de acetonitrilo o de un 30% de metanol, la pasta se disuelve en un corto período de tiempo [16].

Por este motivo, continuamente se investiga sobre el desarrollo de nuevos materiales electródicos similares a la pasta de carbono pero resistentes a los disolventes orgánicos y que puedan ser modificados de forma homogénea. Centrándonos en la ftalocianina de cobalto, un mediador de transferencia electrónica muy apreciado que se había inmovilizado básicamente sobre soportes de pasta de carbono, pueden citarse diversos trabajos en que la pasta tradicional ha sido sustituida por otras matrices más resistentes a los disolventes orgánicos. Por ejemplo, se han fabricado electrodos compósitos consistentes en grafito y CoPC dispersos en resina epoxi, muy resistentes y fáciles de pulir y se han aplicado a la determinación de glutathione [52], ácido ascórbico [53] y tioles [54]. Sin embargo, la principal desventaja de la resina epoxi es que no es posible la renovación del electrodo por relleno, como ocurría con la pasta de carbono.

Huang y Kok proponen el empleo de cemento de grafito conductor como matriz electródica para la ftalocianina de cobalto [51]. Este nuevo electrodo compósito presenta una buena estabilidad en la respuesta cuando se emplea en

sistemas en flujo, y permite el relleno del electrodo. No obstante, su estabilidad en medios con alto contenido en disolventes orgánicos no ha sido demostrada.

Otro material muy interesante sobre el que se ha inmovilizado CoPC ha sido un electrodo compuesto de carbono negro y Kel-F (policlorotrifluoroetileno) [49], habiéndose demostrado la resistencia del electrodo al hinchamiento en metanol y acetonitrilo y aplicándose a la determinación de cisteína mediante HPLC.

L.2.3.- ELECTRODOS COMPOSITOS DE GRAFITO-TEFLON

Los electrodos de grafito-teflón pueden definirse como materiales compósitos segregados que se construyen mezclando cantidades conocidas de ambos componentes en polvo, para posteriormente prensar mecánicamente la mezcla homogeneizada en forma de pastillas con las dimensiones requeridas.

Normalmente, los polvos utilizados para fabricar un material compuesto segregado se escogen de manera que el diámetro medio de las partículas conductoras sea pequeño en relación con las dimensiones de las partículas de polímero. Después del proceso de mezcla y de homogeneización de la misma, las partículas conductoras ocupan los intersticios entre las partículas de polímero más grandes.

Una de las características más atractivas de los electrodos compósitos en general, que ha fomentado la investigación en este campo, es la excelente relación corriente faradaica / corriente de carga que ofrecen, particularmente los materiales compósitos segregados [2]. Las propiedades electroquímicas de este tipo de electrodos dependen en gran parte de la naturaleza del material conductor. Sin duda alguna, como es lógico, los compósitos más estudiados han sido los que contienen grafito o carbono negro, por su buena estabilidad electroquímica, disponibilidad y bajo coste.

Las propiedades físico-químicas del material dependen, sin embargo, fundamentalmente del polímero escogido como fase aislante, principalmente por lo que se refiere a su resistencia mecánica, carácter hidrófobo y resistencia al hinchamiento en disolventes no acuosos. Este último aspecto es especialmente interesante desde un punto de vista práctico, dado que la afinidad de la matriz polimérica por los disolventes orgánicos es la causa de la inestabilidad dimensional de algunos electrodos en medios no acuosos. El hinchamiento de la fase aislante origina un crecimiento de la superficie del electrodo y, por tanto, una mayor corriente de carga. Los electrodos compósitos basados en teflón, Kel-F, polietileno y polipropileno presentan una buena resistencia a algunos disolventes orgánicos [49].

Sin embargo, por otra parte, los materiales compósitos de grafito-polietileno y grafito-polipropileno poseen escasa dureza, por lo que resultan difíciles de manejar y pulir. Por consiguiente, entre los materiales aislantes mencionados anteriormente, el teflón constituye una de las matrices poliméricas más atractivas para su utilización en medios no acuosos, puesto que es prácticamente inerte al hinchamiento y presenta buenas propiedades mecánicas.

En 1975, Klatt y colaboradores [55] evaluaron el comportamiento voltamperométrico, mediante voltamperometría cíclica, de electrodos de grafito y teflón de diferente composición, comparando la resistencia mecánica de las pastillas, la conductividad del electrodo y la forma de los voltamperogramas obtenidos con ferrocianuro. Estos autores examinaron, asimismo, la reproducibilidad de una superficie electródica dada y la reproducibilidad entre diferentes electrodos, concluyendo que presentan excelentes características para su empleo en estudios electroquímicos. Además, demostraron su estabilidad física en medios orgánicos, hidroalcohólicos y fuertemente ácidos.

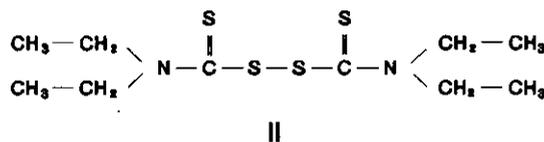
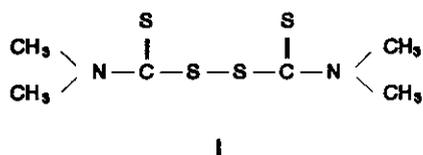
Por otra parte, Shah y Honigberg [56] evaluaron el comportamiento de un electrodo de grafito-teflón como detector en HPLC, demostrándose su utilidad para

la detección electroquímica de distintos compuestos fenólicos y discutiendo un aspecto práctico tan importante como es la pasivación de la superficie del electrodo por dichos compuestos.

Sin embargo, y un poco sorprendentemente, desde 1983 hasta nuestros estudios, sólo se ha encontrado un trabajo publicado más con este tipo de matrices electrónicas compósitas. En 1993, Wang y col. [57] emplearon este material como alternativa para la fabricación de electrodos enzimáticos tridimensionales. Estos bioelectrodos de grafito-teflón se prepararon del modo usual, después de unir covalentemente la enzima al polvo de grafito. El seno del electrodo sirve de este modo como "depósito" tridimensional de la enzima, de manera similar a los correspondientes dispositivos fabricados con pasta de carbono y grafito-epoxi. Los biosensores resultantes combinan así las ventajas de rapidez de respuesta, capacidad de renovación (por pulido), rigidez, facilidad de fabricación y economía.

Si bien como ya se ha dicho, no se han encontrado más referencias donde se utilicen electrodos de grafito-teflón con fines analíticos, no puede dejar de citarse un electrodo compósito segregado similar como es el compuesto por Kel-F y grafito. Se conoce con el nombre de Kel-F al poli(clorotrifluoroetileno), un material algo más rígido que el teflón (poli(tetrafluoroetileno)). Este electrodo se caracterizó por primera vez en 1978 por el grupo de Anderson [58], evaluándose posteriormente su empleo como detector en sistemas en flujo [59] y aplicándose a la determinación en continuo de carbamatos [60] y compuestos fenólicos [61].

L3.- ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS SOBRE LA DETERMINACION DE TIRAM Y DISULFIRAM



Tiram (tetrametiltiuramdisulfuro) (I) y disulfiram (tetraetiltiuramdisulfuro) (II) son dos derivados del ácido ditiocarbámico que presentan actividad fungicida.

Los ditiocarbamatos se emplean fundamentalmente sobre frutas, verduras y cereales para controlar ciertas plagas de hongos que afectan a este tipo de cultivos [62]. El Comité Conjunto FAO/WHO Experto en Residuos de Pesticidas establece un límite para el contenido máximo de ditiocarbamatos que oscila entre 0.1 mg Kg⁻¹ en patatas y 5 mg Kg⁻¹ en cereales [63]. En la CEE, las tolerancias establecidas varían entre 2-7 mg Kg⁻¹ (expresado como bisulfuro de carbono) [63].

Tanto el tiram como el disulfiram se utilizan también como aceleradores para la vulcanización del caucho. Además, el tiram tiene propiedades antisépticas y el disulfiram es un agente empleado en el tratamiento del alcoholismo [64].

Para facilitar la visión en conjunto de los métodos analíticos existentes para la determinación de estos fungicidas, se han resumido, en forma de Tablas, los trabajos aparecidos en los quince últimos años, tomando como base la técnica que permite la determinación. En cada una de las Tablas se incluyen también, cuando se conocen, las características analíticas del método, el tipo de muestra analizado y la forma de llevar a cabo la determinación.

L3.1.- METODOS CROMATOGRAFICOS

En la Tabla IV se resumen los trabajos encontrados en el período de tiempo mencionado basados en técnicas cromatográficas. Existen relativamente pocos métodos basados en el empleo de la *cromatografía de gases (GC)*, probablemente debido al carácter polar de este tipo de compuestos. La mayoría de los métodos encontrados se basan en la hidrólisis ácida de los ditiocarbamatos y posterior inyección del CS₂ formado [63,69-71]. Sin embargo, este método sólo es específico para el grupo ditiocarbamato y no permite la diferenciación de compuestos con diferentes N-alquil sustituyentes.

Mucho más interesante parece la derivatización a ésteres etílicos, con el fin de disminuir la polaridad e incrementar la volatilidad, que permite la determinación conjunta de tiram y disulfiram empleando un detector de nitrógeno-fósforo [68].

La *cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)*, particularmente en la modalidad de fase inversa es, sin lugar a dudas, la técnica cromatográfica más utilizada para la determinación de ditiocarbamatos, . Los límites de detección más bajos se obtienen cuando se emplea extracción líquido-líquido o sólido-líquido [75,89,90,97,104-106], algunas veces "on-line" [81,108,109,112].

El detector más utilizado es el de absorción UV que no requiere derivatización de los analitos. En algunos casos, se emplea derivatización post-columna y la detección se realiza por absorción en el visible [83,85,89] o se emplea detección fluorimétrica [76,86].

También la *cromatografía en capa fina (TLC)* se ha utilizado bastante para la detección y determinación semicuantitativa de ditiocarbamatos, fundamentalmente sobre soportes de gel de sílice [113-115,118-120]. La detección colorimétrica requiere el revelado de las manchas para la formación de especies coloreadas

[113,115,117]. Puede destacarse un curioso sistema de detección biológica, basado en el tratamiento de la placa con un hongo sensible a los ditiocarbamatos, *Botrytis cinerea*, que se incuba durante 48 horas [118].

Por último, se citan algunas aplicaciones de otras técnicas cromatográficas para la determinación de tiram, como la *cromatografía en papel* [121] o la *cromatografía micelar electrocinética* [122].

Tabla IV

Métodos cromatográficos para la determinación de tiram y disulfiram. Cromatografía de gases (GC).

Muestra	Analitos	Tratamiento	Nivel	Detector	Ref.
Plasma	Disulfiram	Columna Chromosorb W empacitada con 3% OV-1	10 ng mL ⁻¹	-	65
Material biológico	Pesticidas	-	-	AFID/FID	66
Lechuga	Ditiocarbamatos	Tratamiento con SnCl ₂ (1.5%) en HCl 5 M para formar CS ₂	0.2 - 9.0 mg Kg ⁻¹	FPD	63
-	Pesticidas	Empleo de columna persilanizada recubierta de fase de metilsilicona y He como gas portador	-	MS	67
Caucho	Tiram, disulfiram	Extn. con CHCl ₃ -Me ₂ CO, derivatización a ésteres etílicos	3.2, 4.6 µg g ⁻¹	AFID	68
Aire	Ditiocarbamatos	Formación de CS ₂	-	-	69
Vegetales	Ditiocarbamatos	Transformación en CS ₂ por calentamiento y dilución con HCl	10 ng mL ⁻¹ CS ₂ (LD)	-	70
-	Tiram	Transformación en CS ₂ por calefacción en medio ácido	-	-	71

AFID: detector de ionización en llama alcalino; FID: detector de ionización en llama; MS: espectrometría de masas; FPD: detector fotométrico de llama.

Tabla IV (Cont.)

Métodos cromatográficos para la determinación de tiram y disulfiram. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).

Muestra	Analitos	Tratamiento	Nivel	Detector	Ref.
Plasma, orina	Disulfiram y metabolitos	-	-	-	72
Suero, plasma	Disulfiram	-	-	-	73
Agua, papel	Tiram	-	-	-	74
Agua, manzanas	Ditiocarbamatos	Extn. con CHCl_3 , clean-up en gel de sílice. Elución con hexano y CHCl_3 , Evap. a sequedad, redisolución en MeOH	0.01 mg L ⁻¹ (LD)	UV	75
-	Compuestos orgánicos con S	R. de intercambio de ligando con Pd(II)-calceína y detección fluorescente de calceína libre	0.5-1.0 ng	FI	76
-	Ditiocarbamatos	Derivatización con NiSO_4 o $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ (pares iónicos)	-	UV	77
Plasma	Disulfiram y metabolitos	Etilación de sus metabolitos y separación en columna alquilfenilo	25 $\mu\text{g L}^{-1}$	-	78
Vegetales	Ditiocarbamatos	Derivatización con soln. alcalina de EDTA y L-cisteína. Extn. Transformación en ésteres metílicos con MeI	0.5 mg Kg ⁻¹	-	79
Lechuga	Fungicidas	Extn. con hexano: CHCl_3 3:2	0.5 - 2.0 mg L ⁻¹	UV	80
Plasma	Disulfiram y metabolitos	Purificación y precon. en precolumna Perisorb RP-18. Separación en Li Chrosorb RP-18	3.4 - 3400 nmol L ⁻¹	UV	81
Fresas, maiz	Tiram	Extn. con CHCl_3 y MeOH. Separación en Separon SIX o Separon NH_2 . Elución con CHCl_3 :ciclohexano	10 - 300 mg Kg ⁻¹	UV	82

Tabla IV (Cont.)

Métodos cromatográficos para la determinación de tiram y disulfiram. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).

Muestra	Analitos	Tratamiento	Nivel	Detector	Ref.
Agua, orina	Tiram, disulfiram	Preconc. en precolumna. Derivatización post-columna con Cu metálico	-	UV/VIS	83
-	Drogas	Sepn. en Separon SGXC-18 con MeCN:fosfato o MeOH:NH ₄ Cl	-	UV	84
Orina	Disulfiram y metabolitos	Preconc. en columna C ₁₈ . Derivatización post-columna con Cu metálico	-	UV/VIS	85
-	Pesticidas	Derivatización post-columna con reactivo OPA-MERC	3.8 µg L ⁻¹	FI	86
Plasma	Disulfiram	-	0.1 - 0.8 µmol L ⁻¹	-	87
Melocotoneros	Fungicidas	Extn. con hexano:EtOAc 80:20, clean up. Elución con MeCN:NH ₄ Cl	0.5 mg L ⁻¹ (LD)	UV	88
Suelos, manzanas, lechugas	Ditiocarbamatos	Extn. con CH ₂ Cl ₂ . Preconc. en columna C ₁₈ . Derivatización post-columna con Cu metálico	50 - 400 µg L ⁻¹	UV/VIS	89
Agua de río, formulaciones	Tiram	Extn. en cartuchos C ₁₈ . Elución con MeOH. Sepn. en C ₁₈ con MeOH:acetato 0.01 mol L ⁻¹ (pH 5)	0.14 mg L ⁻¹ (LD)	EC	90
Alfalfa	Tiram	-	3.4 ng (LD)	PCD	91
Aguas	Pesticidas	Inyección directa (300 µL). Sepn. en columna Biofine RPC-PO. Elución con MeCN:fosfato 71:29 (pH 3.23)	-	UV	92
Manzanas	Tiram	Empleo de dos columnas de alta resolución	0.01 mg L ⁻¹	UV	93

Tabla IV (Cont.)

Métodos cromatográficos para la determinación de tiram y disulfiram. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).

Muestra	Analitos	Tratamiento	Nivel	Detector	Ref.
Verduras	Pesticidas	Extn., sepn. en Lichrospher RP-18 u Octadecyl Si-100 polyol	-	-	94
Aguas	Pesticidas	Extn. con CH ₂ Cl ₂ . Sepn. en columna Wakosil-II 5C ₁₈	-	-	95
Aguas	Pesticidas	Preconcentración por adsorción en minicartucho de gel de poliestireno. Elución con MeCN y sepn. en columna RSpakDE-613 o NOVAPAK C ₁₈	-	-	96
Aguas	Pesticidas	Extn. con CH ₂ Cl ₂ . Sepn. en columna TSK gel ODS. Elución con MeCN:H ₂ O:AcOH 60:40:0.1	0.1 - 1.0 µg L ⁻¹ (LD)	-	97
Aguas	Pesticidas	Elución con 40-45% MeCN (pH 4)	-	UV	98
Aguas	Pesticidas	Extn. en cartuchos Sep-Pak ENVtC ₁₈ . Sepn. en Nucleosil 120-5C ₁₈ . Elución con MeCN:MeOH 60:40	-	-	99
Aguas	Pesticidas	Extn. con columna Sep-Pak Plus PS-1. Elución con MeCN. Sepn. en columna Wakosil-II 5C ₁₈ -100 con MeCN:H ₂ O 60:40	-	UV	100
Aguas	Pesticidas	Extn. con cartuchos C ₁₈	-	-	101
Aguas	Pesticidas	Extn. en cartuchos Sep Pak Plus PS-1	-	-	102
Agua de río	Pesticidas polares	Preconc. Sepn. en C ₁₈ . Elución con gradiente MeCN:agua	2-10 µg L ⁻¹	UV	103

Tabla IV (Cont.)

Métodos cromatográficos para la determinación de tiram y disulfiram. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).

Muestra	Analitos	Tratamiento	Nivel	Detector	Ref.
Cereales	Tiram	Extn. con CH ₂ Cl ₂ o MeCN. Evap. a sequedad. Redisolución con MeOH:agua. Purif. en microcolumna C ₁₈	0.05 mg Kg ⁻¹ (LD)	UV	104
Aguas	Pesticidas	Preconc. en cartuchos Sep-Pak Plus PS-1 a pH 3.5. Elución con MeCN:H ₂ O 18:1	25 µg L ⁻¹	UV	105
Aguas	Pesticidas	Extn. en columnas Sep-Pak Plus PS-1. Elución con MeCN. Sepn. en columna ODS con MeOH:fosfato 0.05 mol L ⁻¹ (pH 3.5) 1:1	0.1 - 1.1 µg L ⁻¹ (LD)	UV	106
Aguas	Pesticidas	Extn. con columna Sep-Pak plus PS-1 a pH 3.5. Elución con MeCN. Sepn. en columna Water Golf-Pak con MeCN:fosfato 0.05 mol L ⁻¹ (pH 3.5)	-	UV	107
Aguas	Pesticidas	Preconc. en minicolumna C ₁₈ . Elución e inyección directa	5 µg L ⁻¹ 0.5 µg L ⁻¹ (LD)	-	108
Agua potable	Pesticidas	Filtración. Preconc. on-line. Elución con MeCN:fosfato 0.5 mmol L ⁻¹ 50:50	5, 10 µg L ⁻¹	-	109
Aguas	Pesticidas	Extn. con cartuchos PS-2 a pH 3.5	0.3, 3 mg L ⁻¹	UV	110
Agua de río	Pesticidas	Extn. con cartuchos Bond-Elut pH	-	-	111
Agua	Pesticidas	Preconc. on-line en precolumna	0.2 - 0.8 µg L ⁻¹ (LD)	UV/Fl	112

EC: Detección electroquímica; PCD: detector de fotoconductividad

Tabla IV (Cont.)

Métodos cromatográficos para la determinación de tiram y disulfiram. Cromatografía en Capa Fina (TLC).

Muestra	Analitos	Tratamiento	Nivel	Detección	Ref.
Material biológico	Tiram, disulfiram	Extn. con hexano:CHCl ₃ 6:4. Sepn. en gel de sílice con Et ₂ O:hexano. Tto. con CuSO ₄	0.2 , 0.3 µg mL ⁻¹ (UD)	VIS	113
Tejidos	Carbamatos	Sepn. en gel de sílice G en Me ₂ CO. Elución con hexano:MeEtCO 19:1	0.5 µg (UD)	-	114
Aguas	Tiram	Extn. con CHCl ₃ . Sepn. en gel de sílice. Tto. con CuSO ₄	1-12 µg	VIS	115
-	Tiram	Sepn. en Silufol con Me ₂ CO:ciclohexano como eluyente	-	-	116
Aguas	Tiram	Sepn. con hexano: Me ₂ CO. Tratamiento de las manchas con ferricianuro:cloruro de hierro	-	VIS	117
Grano, hojas	Fungicidas	Sepn. en gel de sílice G en CHCl ₃ . Desarrollo con CHCl ₃ : Me ₂ CO. Tratamiento con <i>Botrytis cinerea</i> e incubación a 25° durante 48 h	2 mg (UD)	Biológica	118
Aguas	Deriv. del ácido dimetil- y dietil-ditiocarbámico	Sepn. en gel de sílice KSK con hexano:CH ₂ Cl ₂ , ciclohexano:dioxano o hexano:EtOAc	0.02 mg L ⁻¹ (UD)	-	119
Tapones de caucho	Tiram	-	-	UV	120
Vegetales	Pesticidas	Sepn. en gel de sílice	-	-	94

UD: umbral de detección

Tabla IV (Cont.)

Métodos cromatográficos para la determinación de tiram y disulfiram. Otras técnicas cromatográficas.

Muestra	Analitos	Tratamiento	Técnica	Detección	Ref.
-	Pesticidas	Elución con hexano: Me ₂ CO:MeOH. Tto. con esterasa de hígado de bovino. Visualización con acetato de indoxilo	DPC	VIS	121
-	Pesticidas	Seprn. con dodecil sulfato sódico como tensoactivo	MEKC	-	122

DPC: Cromatografía en papel descendiente; MEKC: Cromatografía micelar electrocinética.

I.3.2- METODOS ESPECTROFOTOMETRICOS

Existen numerosos métodos espectrofotométricos que se han empleado para la determinación de tiram, disulfiram y ditiocarbamatos en general, aplicados a muchas clases diferentes de muestras (Tabla V). Todos ellos implican la derivatización de los analitos, bien por formación de complejos coloreados con metales de transición [127,132,136,140-142], o bien por digestión ácida de los ditiocarbamatos, atrapamiento del CS₂ formado y derivatización a productos coloreados [123-125,148,149].

En ningún caso es posible distinguir entre ditiocarbamatos con sustituyentes alquílicos diferentes, puesto que la propiedad utilizada para realizar la determinación es característica del grupo ditiocarbamato.

Tabla V

Métodos espectrofotométricos para la determinación de tiram y disulfiram.

Muestra	Analitos	Tratamiento	Nivel	λ , nm	Ref.
Frutas, verduras	Ditiocarbamatos	Extn. con CHCl_3 . Calentamiento con HCl cc + SnCl_2 . Atrapamiento del CS_2 con KOH en MeOH . Calentamiento con Zn(OAc)_2 para formar ZnS , acidificación y reacción del H_2S con p-aminodimetilamina y Fe^{3+}	-	662	123
Frutas, verduras	Ditiocarbamatos	Calentamiento con SnCl_2 . Absorción del CS_2 en disoln. de Cu(OAc)_2 y dietanolamina en EtOH	20 $\mu\text{g CS}_2$ (LD)	435	124
Patatas	Tiram	Extn. con Me_2CO . Calentamiento con H_2SO_4 cc, hidroquinona y CuSO_4	-	Colorim.	125
Tabletas	Disulfiram	Extn. con CH_2Cl_2 . Tto. con CuI	-	-	126
Polvo atmosférico	Tiram	Conc. por filtración del aire. Tto. con CuI en CHCl_3	25 ng m^{-3} (LD)	425-430	127
Aguas	Ditiocarbamatos	Hidrólisis ácida y atrapamiento del CS_2 sobre reactivo formador de color	-	348,435	128
Caucho	Tiram	Tto. con CoCl_2 en CHCl_3 en presencia de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	-	323	129
Formulaciones	Ditiocarbamatos	Digestión con H_2SO_4 . Absorción del CS_2 en soln. de PhCH_2SH en alcohol tert-butílico	-	430	130
Frutas, verduras	Tiram, etilenbis-ditiocarbamatos	Formación de CS_2 y reacción con Me_2NH y Cu(OAc)_2 para formar complejo coloreado	0.1 mg Kg^{-1}	-	131
Cereales	Tiram	Formación de un complejo coloreado con $\text{CuClO}_4 \cdot 4 \text{ MeCN}$ en MeCN	0.4 mg L^{-1} (LD)	420	132

Tabla V (Cont.)

Métodos espectrofotométricos para la determinación de tiram y disulfiram.

Muestra	Analitos	Tratamiento	Nivel	λ , nm	Ref.
-	Ditiocarbamatos	Descomposición con H_2SO_4 6 M y AcOH. Absorción del CS_2 en soln. alcalina de 1,2,5-trihidroxibenceno y Et_3N . Formación de complejo coloreado con Ni	-	520	133
Formulaciones, agua, cereales y verduras	Tiram, ziram y zineb	Calentamiento con hematoxilina oxidada en agua	-	555	134
-	Ditiocarbamatos	Hidrólisis ácida. Derivatización del CS_2 a dibutilditiocarbamato de Cu(I)	-	-	135
Mezclas sintéticas, preparados comerciales	Ditiocarbamatos	Derivatización a complejos de Se. Extn. en $CHCl_3$	5-10 μg (LD)	430	136
-	Tiram	Reacción con acetato de cromo en medio HOAc/Ac ⁻ (pH 2.5-3.0). Extn. del complejo en MIBK	-	420	137
-	Tiram	Derivatización con Na_2SeO_3 en acetona	1-8 $mg L^{-1}$	420	138
Tejidos	Tiram, tricloro-fenolato de Cu	-	-	390	139
-	Tiram	Derivatización a complejo de Mo(VI). Extn. con isobutilmetilcetona	1.2 $mg L^{-1}$	420	140
-	Ditiocarbamatos	Formación de complejos de Cr. Extn. en naftaleno y DMF	6-12 μg	430	141

Tabla V (Cont.)

Métodos espectrofotométricos para la determinación de tiram y disulfiram.

Muestra	Analitos	Tratamiento	Nivel	λ , nm	Ref.
-	Tiram	Formación de dimetilditiocarbamato de Cu(II) y Pd(II). Coprecipitación en naftaleno microcristalino	-	395,430	142
Lechugas	Tiram, zineb	Adición de HCl 2.4 mol L ⁻¹ con SnCl ₂	-	-	143
-	Disulfiram	Formación de complejo coloreado con Cu	-	-	144
-	Ditiocarbamatos	Hidrólisis ácida. Absorción sobre aminas en MeOH	0.3 mg L ⁻¹ CS ₂ (LD)	-	145
Preparados comerciales	Tiram, ziram, dibam y ferbam	Formación de complejos de Cr. Adsorción en naftaleno microcristalino	-	-	146
Formulaciones comerciales	Tiram, zineb, glutation	Inducción de la reacción triyoduro-azida en medio micelar	5.4x10 ⁻⁹ mol L ⁻¹ (LD)	500	147
Agua	Ditiocarbamatos	Hidrólisis ácida. Absorción del CS ₂ sobre etilendiamina o piperidina en MeOH	1-10 mg L ⁻¹	-	148
Suelos, verduras	Tiram, metam	Formación de CS ₂ . Derivatización a complejos coloreados de Cu(II)	-	-	149

1.3.3.- METODOS ELECTROQUIMICOS

Se han encontrado relativamente pocas aplicaciones de los métodos electroquímicos para la determinación de tiram y disulfiram (Tabla VI). En la mayoría de los casos se basan en la reducción del fungicida sobre electrodos de mercurio [150,152,153,154], aunque también se ha aprovechado la oxidación del tiram sobre un electrodo de Au [1].

Los métodos basados en la preconcentración de tiram por adsorción sobre la superficie del electrodo [1,153] permiten alcanzar límites de detección más bajos que los obtenidos con otras técnicas. No obstante, la selectividad es insuficiente para su aplicación al análisis de trazas en muestras medioambientales, por lo que se hace necesario recurrir a la detección electroquímica en sistemas cromatográficos [90].

1.3.4.- METODOS VOLUMETRICOS

En la bibliografía revisada aparecen varios métodos volumétricos de determinación de tiram y disulfiram, cuyas características principales se recogen en la Tabla VII. Debido a la escasa sensibilidad de este tipo de métodos de análisis, se han aplicado fundamentalmente a la determinación de estos ditiocarbamatos en medicamentos [160,165] y formulaciones comerciales [156,157,162,163]. En la mayoría de los casos, el punto final se detecta potenciométrica o amperométricamente [157-162,165].

Tabla VI

Métodos electroquímicos para la determinación de tiram y disulfiram.

Muestra	Analitos	Tratamiento	Nivel	Técnica	Detector	Ref.
Medica- mentos	Disulfiram, fármacos	-	-	DPP, CV	-	150
-	Tiram, compuestos orgánicos con S	-	1×10^{-6} mol L^{-1} (LD)	CSV	Ag o película Hg	151
-	Disulfiram	Medio $\text{H}_2\text{O}:\text{EtOH}$ con NaOAc $0.1-0.3 \text{ mol L}^{-1}$	-	-	Hg	152
Agua, suelos	Tiram	Extn. en cartuchos C_{18} (aguas) o con CHCl_3 (aceites). Evap. a sequedad. Redisoln. en MeOH	0.03 $\mu\text{g L}^{-1}$ (LD)	AdSV	HMDE	153
Preparados comercia- les, aguas	Tiram	Extn. con MeOH (preparados). Extn. con cartuchos C_{18} (aguas). Elución con MeOH . Evap. a sequedad. Redisoln. con MeOH	$0.3 \mu\text{g L}^{-1}$ (LD)	AdSV	Au rotatorio	1
-	Disulfiram	Empleo de soluciones de Bu_4NI y H_2SO_4 en DMF , EtOH o mezclas orgánico-acuosas	0.3 mg	P	Hg	154
Manzanas	Tiram	Hidrólisis ácida. Absorción del CS_2 sobre piperidina en MeOH	$1.5-9.2$ $\mu\text{mol L}^{-1}$	DPP	Hg	155

DPP: Polarografía diferencial de impulsos; CV: voltamperometría cíclica; CSV: voltamperometría de redisolución catódica; AdSV: voltamperometría de adsorción-redisolución; P: polarografía.

Tabla VII

Métodos volumétricos para la determinación de tiram y disulfiram.

Muestra	Analitos	Tratamiento	Nivel	Detección	Ref.
Formula- ciones comerciales	Tiram	Reducción con Na_2S y valoración ácido-base de la dietilamina formada	-	-	156
Preparados comerciales	Tiram	Reducción con Na_2SO_3 en Me_2CO o $\text{EtOH}:\text{DMF}$. Valoración con CuSO_4 0.1 mol L^{-1}	-	Potenciom.	157
-	Aceleradores de vulcanización	Valoración con Na_2SO_3 del I_2 liberado por reacción con HI a 0° en MeOH acuoso	-	Amperom.	158
-	Tiram, disulfiram	Valoración por reducción con K_2CS_3 en $\text{DMF}:\text{H}_2\text{O}$	-	Visual, potenciom.	159
Tabletas	Disulfiram, metiltiouracil	Derivatización con $\text{Hg}(\text{OAc})_2$. Valoración como bases en HOAc y HClO_4 0.1 mol L^{-1}	-	Potenciom. (pH)	160
-	Xantatos, ditiocarbamatos, fungicidas	Valoración con yoduro generado electroquímicamente	> 5 $\mu\text{equiv.}$	Amperom.	161
Preparados comerciales	Tiram	Valoración con tritioarbonato K en $\text{DMF}:\text{H}_2\text{O}$	-	Potenciom.	162
Preparados comerciales	Tiram	Valoración con tritioarbonato K	-	Fotom. ($\lambda=$ 400 nm)	163
-	Tiuram disulfuros	Valoración con tritioarbonato K	-	Fotom.	164
Medica- mentos	Disulfiram	Valoración con Cu^{2+}	0.36-0.71 mg	Potenciom.	165
-	Tiuram disulfuros (tiram, disulfiram)	Reacción de azida sódica con yoduro en presencia del tiuram disulfuro (inductor). Valoración del exceso de yoduro con arsenito sódico	0.5-14 μg	Visual	166

II.- PARTE EXPERIMENTAL



II.1.- DETERMINACION DE TIRAM Y DISULFIRAM CON UN ELECTRODO DE PASTA DE CARBONO MODIFICADO CON FTALOCIANINA DE COBALTO

II.1.1.- INSTRUMENTACION

II.1.1.1.- Aparatos

Las medidas en discontinuo se han realizado utilizando un potenciostato EG&G PARC 273 equipado con el software de Análisis Electroquímico Mod. 270. La agitación durante la etapa de preconcentración se ha llevado a cabo con un agitador magnético P-Selecta.

Para los experimentos en continuo se ha utilizado un sistema de inyección de flujo constituido por una bomba peristáltica Wiz (ISCO) y una válvula Valco (Metrohm) con volumen de inyección variable. Como detector se ha empleado un detector electroquímico EG&G PARC Mod. 400 acoplado a un registrador Linseis 6512 y equipado con una célula de flujo "thin-layer" modelo MP-1305, en la cual se ha reemplazado el electrodo de carbono vitrificado por una pieza idéntica que presenta una cavidad de 3 mm de diámetro en lugar del disco de carbono vitrificado. Dicha cavidad se rellena con la pasta de carbono modificada.

Para las medidas de pH se ha empleado un pH-metro de precisión Metrohm E 510.

Otros aparatos utilizados han sido: baño de ultrasonidos P-Selecta Ultrasons, centrifugadora P-Selecta Meditronic y rotavapor Heidolph W 2000.

II.1.1.2.- Electrodo y células de trabajo

Como electrodo *indicador* se ha utilizado un electrodo de pasta de carbono modificada con ftalocianinas metálicas, empleando como soporte para los estudios en discontinuo, un electrodo hueco Metrohm 6.0807.000 (3.0 mm de diámetro de zona activa) y, para los experimentos en continuo, el electrodo hueco descrito en el apartado II.1.1.1. acoplable a la célula de flujo "thin-layer" modelo MP-1305. La preparación de los electrodos se describe en el apartado II.1.3.1.

Para las medidas en discontinuo se ha utilizado como electrodo de *referencia* un electrodo de calomelanos saturado EG&G PARC Mod. K0077 y como electrodo *auxiliar* una punta de platino. Como *célula de trabajo* se ha empleado una célula electroquímica Metrohm EA 875-20.

Para los estudios en flujo, la célula de trabajo ha sido, como ya se ha comentado, una *célula electroquímica* para cromatografía líquida modelo MP-1305. El electrodo de *referencia* utilizado ha sido un electrodo de Ag/AgCl modelo P/N 219054.

II.1.2.- REACTIVOS

Para la preparación de los electrodos de pasta de carbono se ha utilizado grafito en polvo (Ultra F, Dicoex) y aceite de parafina (Fluka). La modificación se ha realizado con diferentes ftalocianinas metálicas: de cobalto (Fluka), de níquel (Fluka) y de hierro (Kodak), que se usaron tal como se recibieron, sin purificación posterior.

Los *fungicidas* analizados en este estudio han sido: tetrametiltiuram disulfuro (tiram), tetraetiltiuram disulfuro (disulfiram) y dimetilditiocarbamato de zinc (ziram),

todos ellos de la marca Aldrich. Otros *reactivos* empleados han sido: fenol (Sigma) y sulfato de zinc (Merck).

Para la preparación de las disoluciones reguladoras se ha utilizado ácido bórico (Panreac), ácido acético (Carlo Erba), ácido fosfórico (Carlo Erba), NaOH (Panreac), NaH_2PO_4 (Fluka) y Na_2HPO_4 (Panreac). Como disolventes orgánicos se han empleado metanol y cloroformo (Panreac). Todos los productos utilizados han sido de calidad para análisis. Siempre se ha trabajado con agua ultrapura obtenida mediante un sistema Millipore Milli-Q.

Las *muestras* analizadas han sido fresas adquiridas en un mercado local.

II.1.3.- PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

II.1.3.1.- Preparación del electrodo modificado

II.1.3.1.1.- *Preparación de la pasta de carbono modificada con ftalocianinas metálicas*

La pasta de carbono modificada se prepara pesando exactamente la cantidad de grafito y ftalocianina necesarias para obtener la proporción modificador/grafito deseada (expresada como porcentaje de modificador). Se añaden 0.4 mL de aceite de parafina y 5 mL de cloroformo por cada gramo de mezcla (grafito + ftalocianina). Se agita la mezcla en un baño de ultrasonidos durante 3 minutos para asegurar su homogeneidad. A continuación se evapora el cloroformo haciendo pasar una corriente de argón hasta sequedad aparente. Por último, se deja secar la pasta resultante al aire durante una noche a temperatura ambiente.

II.1.3.1.2.- *Preparación del electrodo indicador para la medida*

Con la pasta preparada como se describe en el apartado anterior, se rellena la cavidad del electrodo de trabajo, procurando que el empaquetamiento sea lo más compacto posible, y se pule la superficie durante 1 minuto sobre una hoja de papel de ordenador. En los estudios en discontinuo se renueva la superficie electródica después de cada experimento, retirando la pasta usada del exterior del electrodo (aproximadamente 1 mm de profundidad) y sustituyéndola por pasta nueva.

II.1.3.2.- *Preparación de disoluciones*

- *Disoluciones patrón de tiram y disulfiram*: Se prepararon semanalmente disolviendo las cantidades adecuadas de cada fungicida en 50 mL de metanol para obtener una concentración final de $2.5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. A partir de estos patrones se prepararon diariamente, por dilución con metanol, disoluciones estándar más diluidas.

- *Disolución patrón de ziram*: Se preparó disolviendo la cantidad adecuada en 100 mL de metanol para obtener una concentración final de $5.0 \times 10^{-4} \text{ M}$.

- *Disoluciones patrón de fenol y sulfato de zinc*: Se prepararon disolviendo las cantidades adecuadas de cada compuesto en 50 mL de agua desionizada de forma que la concentración final sea de $2.5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. A partir de estas disoluciones se preparan, por dilución, disoluciones estándar más diluidas.

- *Disolución reguladora $\text{HBO}_2/\text{BO}_2^-$ 0.2 mol L⁻¹ de pH 8.0*: Se disuelven 12.4 g de HBO_2 en aproximadamente 800 mL de agua desionizada. Se añade NaOH 2 M hasta alcanzar pH 8.0 y se completa con agua destilada hasta un volumen final de 1 litro.

- *Disolución reguladora $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ 0.2 mol L⁻¹ de pH 6.0*: Se disuelven 24.0 g de NaH_2PO_4 en aproximadamente 800 mL de agua desionizada. Se añade NaOH 2 M hasta alcanzar pH 6.0 y se completa con agua destilada hasta un volumen final de 1 litro.

- *Disolución Britton-Robinson 0.2 mol L⁻¹*: Se prepara disolviendo 12.4 g de ácido bórico, 11.5 mL de ácido acético y 13.6 mL de ácido fosfórico en 1 litro de agua destilada.

- *Disoluciones reguladoras Britton-Robinson/NaOH*: Se preparan añadiendo pequeñas cantidades de una disolución de NaOH 2 M a diferentes alícuotas de la disolución anterior hasta obtener el pH deseado.

- *Disolución de trabajo de tiram*: En un matraz aforado de 50 mL se añaden 25 mL de la disolución reguladora HBO_2/BO_2^- , el volumen necesario de disolución patrón de tiram en metanol para conseguir la concentración final deseada en cada experimento, la cantidad necesaria de metanol puro para alcanzar una proporción final del 2% de metanol y agua desionizada hasta completar los 50 mL.

Para el estudio de pH se sustituye el regulador HBO_2/BO_2^- por 25 mL de disolución Britton-Robinson ajustada previamente al pH deseado con NaOH.

En el estudio de interferencias se añade, además, la cantidad adecuada de la disolución patrón de la sustancia correspondiente para obtener la proporción interferente:tiram deseada en cada caso.

- *Disolución de trabajo de disulfiram*: En un matraz aforado de 50 mL se añaden 25 mL de la disolución reguladora $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$, el volumen necesario de disolución patrón de disulfiram en metanol para conseguir la concentración final deseada en cada experimento, la cantidad necesaria de metanol puro para alcanzar

una proporción final del 2% de metanol y agua desionizada hasta completar los 50 mL.

Para el estudio de pH se sustituye el regulador $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ por 25 mL de disolución Britton-Robinson ajustada previamente al pH deseado con NaOH.

En el estudio de interferencias se añade, además, la cantidad adecuada de la disolución patrón de la sustancia correspondiente para obtener la proporción interferente:disulfiram deseada en cada caso.

- *Mezclas de tiram y disulfiram*: Para el análisis multicomponente de tiram y disulfiram mediante métodos quimiométricos, se prepararon mezclas de tiram y disulfiram de la siguiente forma: en un matraz aforado de 50 mL se añaden 25 mL de la disolución reguladora $\text{HBO}_2/\text{BO}_2^-$, el volumen necesario de disolución patrón de cada fungicida en metanol para conseguir las concentraciones finales deseadas en cada experimento, la cantidad necesaria de metanol puro para alcanzar una proporción final del 2% de metanol y agua desionizada hasta completar los 50 mL.

- *Disolución portadora*: Se disuelven 6.2 g de HBO_2 en unos 800 mL de agua desionizada, se añade NaOH 2 M hasta ajustar el pH a 8.0 y 20.0 mL de metanol, completando con agua desionizada hasta un volumen total de 1 litro. La composición final es del 2% v/v en metanol y de 0.1 mol L^{-1} $\text{HBO}_2/\text{BO}_2^-$.

II.1.3.3.- Obtención de los voltamperogramas en discontinuo

El electrodo de pasta de carbono modificado, preparado como se describe en el apartado II.1.3.1, se sumerge en la célula de medida que contiene la disolución de trabajo del fungicida y se mantiene, a circuito abierto y con agitación constante, 3000 rpm, durante el tiempo de preconcentración predeterminado en cada caso.

Transcurrido el período de acumulación se detiene la agitación y se procede a la medida.

Las técnicas electroanalíticas utilizadas han sido voltamperometría cíclica (CV), voltamperometría de barrido lineal (LSV) y voltamperometría diferencial de impulsos (DPV).

II.1.3.4.- Determinación de tiram en fresas contaminadas

Se pesan con exactitud aproximadamente 15 g de fresas troceadas en un tubo de centrifuga de 40 mL y se añaden 50 μL de una disolución patrón de tiram de 600 mg L^{-1} en metanol. Se procede a extraer con 2 porciones de 15 mL de cloroformo. El tubo se agita manualmente durante 5 minutos cada vez y se centrifuga durante 5 minutos a 4000 rpm. Se combinan los dos extractos en un matraz de fondo redondo de 50 mL y se evapora hasta sequedad en el rotavapor a temperatura ambiente. El residuo se disuelve en 0.5 mL de metanol, se añaden 12.5 mL de la disolución reguladora $\text{HBO}_2/\text{BO}_2^-$ 0.2 mol L^{-1} de pH 8.0, se agita en baño de ultrasonidos unos 2 minutos y la disolución resultante se transfiere cuantitativamente a un matraz aforado de 25 mL, enrasando con agua desionizada. Esta disolución se transfiere a la célula de medida y se registra el voltamperograma correspondiente según el procedimiento descrito en el apartado II.1.3.3, empleando un período de acumulación de 180 s. La determinación de tiram se lleva a cabo aplicando el método de adiciones estándar, añadiendo cantidades de tiram comprendidas entre 30 y 75 μg .

II.1.3.5.- Medidas por inyección en flujo con detección amperométrica de impulsos

Se hace circular la disolución portadora por el sistema FIA descrito en el apartado II.1.1.1, se aplica al electrodo modificado el programa de potenciales escogido (apartado III.2.2) y se espera el tiempo necesario hasta obtener una señal constante. Se inyectan entonces alícuotas de la disolución de trabajo de tiram en la corriente de portador, registrando las señales amperométricas correspondientes.

II.2.- DESARROLLO DE ELECTRODOS COMPOSITOS DE GRAFITO-TEFLON. DETERMINACION VOLTAMPEROMETRICA DE TIRAM Y DISULFIRAM

II.2.1.- INSTRUMENTACION

II.2.1.1.- Aparatos

Todas las medidas se han realizado utilizando un potenciostato Eco Chemie Autolab PSTAT 10 equipado con software de análisis electroquímico GPES 3.1.

La agitación durante la etapa de preconcentración se ha realizado con un agitador magnético P-Selecta.

Para las medidas de pH se ha empleado un pH-metro de precisión Metrohm E 510.

Otros aparatos utilizados han sido: baño de ultrasonidos P-Selecta Ultrasons, centrifugadora P-Selecta Meditronic, rotavapor Heidolph W 2000 y prensa hidráulica Carver.

II.2.1.2.- Electrodo y células de trabajo

Como electrodos *indicadores* se han utilizado electrodos compósitos de grafito y teflón cuya preparación se detalla en el apartado II.2.3.1. El electrodo de *referencia* ha sido un electrodo de calomelanos saturado EG&G PARC Mod. K0077 y el electrodo *auxiliar* una punta de platino.

La *célula* de trabajo ha sido una célula electroquímica Metrohm EA 875-20.

II.2.2.- REACTIVOS

Para la preparación de los electrodos compósitos se ha utilizado grafito en polvo de pureza ultra F (Dicoex) y poli(tetrafluoroetileno) -teflón- (Tipo 7A, Dupont). Para su fijación en el soporte electródico se ha utilizado resina epoxi (Araldit).

Los *fungicidas* utilizados en este estudio, así como el resto de reactivos, han sido los mismos ya mencionados en el apartado II.1.2. Como disolventes orgánicos se han empleado metanol, n-hexano y cloroformo (Panreac).

II.2.3.- PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

II.2.3.1.- Preparación del electrodo compuesto de grafito y teflón

II.2.3.1.1.- Preparación del material compuesto

Las pastillas de grafito-teflón se prepararon de la siguiente manera. Se pesan las cantidades adecuadas de grafito y de teflón dependiendo de la composición final que se desee, se mezclan y se homogeneiza dicha mezcla manualmente con ayuda de una espátula plana. Se añaden, a continuación, 5.0 mL de n-hexano por 0.5 gramos de mezcla y se agita la pasta resultante en un baño de ultrasonidos durante 5 minutos para asegurar su homogeneidad. Seguidamente se evapora el n-hexano haciendo pasar una corriente de aire caliente hasta sequedad, dejando posteriormente enfriar la mezcla a temperatura ambiente. La pasta resultante seca se prensa en forma de pastillas de 1.3 cm de diámetro aplicando una presión de 5000 Kg cm⁻² durante unos 15 minutos. El espesor de dichas pastillas es de aproximadamente 0.4 cm.

II.2.3.1.2.- Preparación del electrodo indicador

Se prepara una pastilla de grafito-teflón de 0.5 g siguiendo el procedimiento descrito en el apartado anterior. Con ayuda de un troquel de 3.5 mm de diámetro interno, se taladra una porción de pastilla en forma de disco y se introduce parcialmente en el extremo de un tubo hueco de vidrio de 10 cm de longitud y 4 mm de diámetro interno. La fijación de la pastilla al extremo del tubo se realiza con resina epoxi, impregnando el tubo y los bordes de la pastilla que sobresalen de forma que solamente la superficie del disco quede sin recubrir. Se deja secar la resina durante 24 horas a temperatura ambiente y, a continuación, se introducen por el otro extremo del tubo unas gotas de mercurio, estableciéndose el contacto eléctrico mediante un hilo de cobre que sobresale parcialmente por este extremo del tubo. Finalmente, se cierra dicho extremo con resina epoxi.

II.2.3.2.- Pretratamiento del electrodo indicador

La superficie del electrodo compuesto de grafito-teflón, preparado como se describe en el apartado anterior, se renueva diariamente por pulido de dicha superficie con un papel abrasivo de SiC con un tamaño de grano de 150 durante unos cinco segundos. Como etapa previa a la realización de cada voltamperograma, se procede al tratamiento electroquímico de la superficie del electrodo mediante la aplicación de un potencial constante de -1.2 V vs. SCE durante 30 segundos.

II.2.3.3.- Preparación de disoluciones

Las disoluciones patrón de tiram, disulfiram, ziram, fenol y sulfato de zinc, así como las disoluciones reguladoras Britton-Robinson/NaOH, se prepararon de la forma ya especificada en el apartado II.1.3.2.

- *Disolución reguladora $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ 0.2 mol L⁻¹ de pH 7.4:* Se disuelven 12.1 g de NaH_2PO_4 y 14.3 g de Na_2HPO_4 en aproximadamente 800 mL de agua desionizada. Se añade NaOH 2 M hasta alcanzar pH 7.4 y se completa con agua destilada hasta un volumen final de 1 litro.

- *Disolución de trabajo de tiram y disulfiram:* En un matraz aforado de 50 mL se añaden 25 mL de la disolución reguladora $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$, el volumen necesario de disolución patrón de fungicida para conseguir la concentración final deseada en cada experimento y agua desionizada hasta completar los 50 mL.

Para el estudio de pH se sustituye el regulador $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ por 25 mL de disolución Britton-Robinson ajustada previamente al pH deseado con NaOH.

En el estudio de interferencias se añade, además, la cantidad adecuada de la disolución patrón de la sustancia correspondiente para obtener la proporción interferente:analito deseada en cada caso.

II.2.3.4.- Obtención de los voltamperogramas

El electrodo compuesto de grafito-teflón se sumerge en la célula de medida que contiene la disolución de trabajo del fungicida correspondiente y se aplica un potencial de -1.2 V vs. SCE durante 30 segundos con el fin de regenerar la superficie del electrodo, como se ha indicado en el apartado II.2.3.2. A continuación se mantiene a 0.0 V vs. SCE y con agitación constante a 3000 rpm durante el tiempo de preconcentración previamente escogido. Transcurrido el período de acumulación, se detiene la agitación y se registra el voltamperograma correspondiente, desde 0.0 V hacia potenciales más positivos.

Para la elección del potencial catódico apropiado para la regeneración electroquímica de la superficie electródica, se procedió a la desoxigenación de la disolución de trabajo, haciendo pasar una corriente de argón durante 20 minutos.

Las técnicas electroanalíticas utilizadas han sido voltamperometría cíclica (CV) y voltamperometría de barrido lineal (LSV).

II.2.3.5.- Determinación de tiram en fresas contaminadas

Se pesan con exactitud aproximadamente 15 g de fresas troceadas en un tubo de centrífuga de 40 mL y se añaden 50 μL de una disolución patrón de 600 mg L^{-1} de tiram en metanol. Se procede a extraer con 2 porciones de 15 mL de cloroformo. El tubo se agita manualmente durante 5 minutos cada vez y se centrifuga durante 5 minutos a 4000 rpm. Se combinan los dos extractos en un matraz de fondo redondo

de 50 mL y se evapora hasta sequedad en el rotavapor a temperatura ambiente. El residuo se disuelve en 0.5 mL de metanol. A continuación se añaden 12.5 mL de la disolución reguladora $\text{H}_2\text{PO}_4/\text{HPO}_4^{2-}$ 0.2 mol L^{-1} de pH 7.4 y se agita en ultrasonidos unos 2 minutos. La disolución se transfiere cuantitativamente a un matraz aforado de 25 mL, completando el volumen con agua desionizada. Esta disolución se transfiere a la célula de medida y se registra el voltamperograma de barrido lineal correspondiente, según el procedimiento descrito en el apartado II.2.3.4, empleando un período de acumulación de 300 s. La determinación de tiram se lleva a cabo aplicando el método de adiciones estándar, añadiendo cantidades de tiram comprendidas entre 30 y 75 μg .

II.3.- ELECTRODOS DE GRAFITO-TEFLON COMO DETECTORES ELECTROQUIMICOS EN SISTEMAS EN FLUJO

II.3.1.- INSTRUMENTACION

II.3.1.1.- Aparatos

Se ha utilizado un sistema de inyección en flujo constituido por una bomba peristáltica Gilson Minipuls-2 y una válvula Rheodyne Mod. 5020 con volumen de inyección variable. Para la detección se ha empleado un detector Metrohm 656 equipado con una célula de flujo, de configuración "wall-jet", EA-1096. El control de los potenciales y el registro de las señales amperométricas se ha llevado a cabo por medio de un potencióstato Eco Chemie Autolab PSTAT 10 equipado con software de análisis electroquímico GPES 3.1.

Para la separación de tiram y disulfiram, se ha acoplado al sistema FIA descrito una columna de teflón de 3 cm de longitud y 2 mm de diámetro interno, rellena con fase estacionaria VYDAC SC-201 RP (Macherey-Nagel) de 30-40 μm

de diámetro de partícula. Esta columna separadora se coloca entre la válvula de inyección y el detector como se indica en la figura 3, de forma que sea posible invertir el sentido del paso de la disolución portadora por dicha columna con el fin de evitar la obstrucción de la misma. En el esquema que se muestra en la figura 3, cuando las llaves 1 y 3 están abiertas y las llaves 2 y 4 cerradas, el portador entra en la columna por la parte superior y sale por la inferior hacia el detector. Cerrando 1 y 3 y abriendo 2 y 4, el portador entrará en la columna por la parte inferior y saldrá hacia el detector por la parte superior.

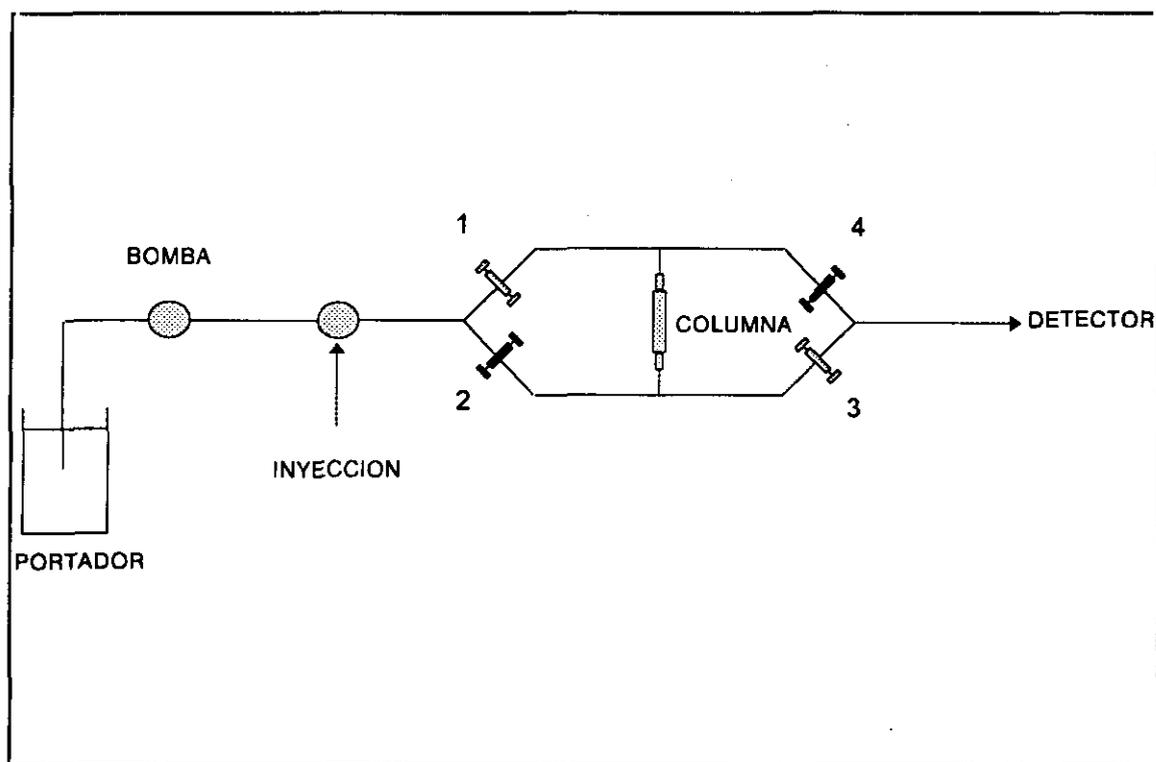


Figura 3

Esquema del dispositivo experimental empleado para la separación en continuo de tiram y disulfiram

Otros aparatos utilizados han sido: baño de ultrasonidos P-Selecta Ultrasons y rotavapor Heidolph W-2000.

II.3.1.2.- Electrodo

Como electrodo *indicador* se ha utilizado un electrodo compuesto de grafito-40% teflón cuya preparación se detalla en el apartado II.3.3.1. El electrodo de *referencia* ha sido un electrodo de Ag/AgCl/KCl 3M Metrohm Modelo 6.0727.000 y el electrodo *auxiliar* un electrodo de oro Metrohm Modelo 6.0333.010.

II.3.2.- REACTIVOS

Los reactivos utilizados han sido los mismos que en el apartado II.2.2.

Como disolventes orgánicos se han empleado metanol, acetonitrilo y diclorometano (Panreac).

Las *muestras* analizadas han sido agua potable y agua de pozo, ambas de procedencia local, contaminadas con $40 \mu\text{g L}^{-1}$ de tiram.

II.3.3.- PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

II.3.3.1.- Preparación del electrodo compuesto de grafito-teflón

Se prepara una pastilla de grafito-40% de teflón de 1 gramo siguiendo el procedimiento descrito en el apartado II.2.3.1.1. Con ayuda de un troquel de 3.5 mm de diámetro interno, se taladra una porción de pastilla en forma de disco y se introduce a presión en el extremo de un tubo hueco de teflón de 8 cm de longitud y 3 mm de diámetro interno. El contacto eléctrico se realiza a través de un tornillo de acero inoxidable introducido por el otro extremo del tubo de teflón.

II.3.3.2.- Pretratamiento del electrodo compuesto de grafito-teflón

La superficie del electrodo compuesto de grafito-teflón se renueva diariamente por pulido con un papel abrasivo de SiC con un tamaño de grano de 150 durante unos cinco segundos. No fue necesario ningún otro tipo de regeneración química o electroquímica posterior de la superficie electródica durante toda la jornada de trabajo

II.3.3.3.- Preparación de disoluciones

Las disoluciones patrón de los fungicidas, las disoluciones reguladoras y las disoluciones de trabajo de tiram y disulfiram se prepararon análogamente a lo especificado en el apartado II.2.3.3.

- *Disolución portadora $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ 0.1 mol L⁻¹ de pH 7.4:* Se disuelven 6.0 g de NaH_2PO_4 y 7.2 g de Na_2HPO_4 en aproximadamente 800 mL de agua desionizada. Se añade NaOH 2 M hasta alcanzar pH 7.4 y se completa con agua destilada hasta un volumen final de 1 litro. En el caso de la determinación de tiram en muestras de aguas, la disolución portadora contiene un 2% v/v de metanol.

- *Fase móvil utilizada en la separación de tiram y disulfiram:* 25 mL de una disolución reguladora $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ 2.0 mol L⁻¹ de pH 7.4 se llevan a un matraz de 500 mL diluyendo con agua desionizada. Se añade el volumen necesario de acetonitrilo para obtener la proporción final regulador fosfato 0.1 mol L⁻¹:acetonitrilo deseada y se enrasa con agua desionizada. Las disoluciones de trabajo de tiram y disulfiram, en este caso se prepararon en el mismo medio que la fase móvil, tomando alícuotas de dicha fase móvil y añadiendo la cantidad de patrón correspondiente para obtener la concentración final deseada.

II.3.3.4.- Medidas por inyección en flujo con detección amperométrica

Se inyecta la disolución de trabajo de fungicida en la corriente de portador y se registran las señales amperométricas al potencial aplicado al electrodo indicador, previamente escogido. En estas medidas no se requirió ningún tipo de limpieza o pretratamiento del electrodo compuesto después de cada inyección.

II.3.3.5.- Determinación de tiram en aguas contaminadas

Se toman 50 mL de la muestra de agua, se añaden 50 μL de una disolución patrón de 40 mg L^{-1} de tiram y se transfieren a un embudo de decantación de 150 mL. Se procede a extraer el fungicida con 2 porciones de 5 mL de diclorometano, agitando durante 3 minutos. Los extractos se combinan y se evaporan hasta sequedad en el rotavapor a temperatura ambiente. El residuo se disuelve en 1 mL de disolución portadora (regulador fosfato 0.1 mol L^{-1} de pH 7.4 con un 2% v/v de metanol) con ayuda de agitación ultrasónica y se inyectan 2 alícuotas de 250 μL en el portador, que fluye a una velocidad de 1.9 mL min^{-1} . La determinación de tiram se lleva a cabo por medio de un calibrado en el intervalo 0.5 - 4.0 mg L^{-1} , obtenido por adición de alícuotas de la disolución patrón de fungicida a una muestra de agua sin contaminar (blanco) sometida al mismo tratamiento descrito anteriormente.

II.3.3.6.- Preconcentración por adsorción en continuo

La disolución portadora se hace circular por el sistema FIA descrito en el apartado II.3.1.1., aplicándose al electrodo indicador un potencial de -1.2 V durante 30 s con el fin de regenerar su superficie, del mismo modo a como se realiza en las experiencias en discontinuo (apartado II.2.3.2). A continuación, se registra un voltamperograma de barrido lineal entre +0.5 y +1.2 V, comprobándose que no

aparece ninguna señal de oxidación tras esta etapa de regeneración electroquímica. Posteriormente, deteniendo momentáneamente la bomba peristáltica y cambiando el extremo del tubo de un recipiente a otro, se hace circular por el sistema la disolución adecuada de trabajo de tiram o disulfiram con un caudal previamente seleccionado de 2.7 mL min^{-1} . Al cabo de 30 s, que es el tiempo necesario para que la disolución que comienza a circular alcance el detector, se inicia la preconcentración aplicando al electrodo indicador un potencial de +0.0 V durante el tiempo deseado. Transcurrido este período, se hace circular de nuevo la disolución portadora por el sistema FIA y, una vez alcanzado el detector al cabo de 30 s, se registra un voltamperograma de barrido lineal desde +0.5 hasta +1.2 V para la medida del fungicida adsorbido sobre la superficie del electrodo.

II.3.3.7- Separación en continuo de tiram y disulfiram

La columna de teflón empleada para la separación, descrita en el apartado II.3.1.1. y rellena diariamente con la fase estacionaria, se acondiciona haciendo pasar acetonitrilo durante dos minutos en cada dirección. Una vez preparada, se monta el dispositivo que se muestra en la figura 3 y se hace pasar la fase móvil por el sistema. Cuando la señal de fondo registrada para el portador es estable (normalmente tras unos 10 minutos), se invierte el sentido de paso de dicha disolución a través de la columna (apartado II.3.1.1) y se inyecta una alícuota de la disolución de trabajo mezcla de tiram y disulfiram, preparada en la misma disolución portadora, registrando las señales amperométricas de ambos fungicidas. Después de cada uno de estos registros (aproximadamente 10 minutos), se invierte de nuevo el sentido del flujo y puede realizarse una nueva medida.

II.4.- DETECCIÓN ELECTROQUÍMICA EN HPLC CON UN ELECTRODO DE GRAFITO-TEFLON. DETERMINACION DE TIRAM Y DISULFIRAM

II.4.1.- INSTRUMENTACION

II.4.1.1.- Aparatos

El equipo utilizado está constituido por una bomba Waters Modelo 510 (Millipore) conectada a una columna de 10 cm de longitud y 0.46 cm d.i. empaquetada con fase estacionaria Lichrosorb RP 18 de 5 μm de tamaño de partícula (Teknokroma). Las muestras se inyectaron a través de una válvula de inyección Valco (Metrohm) provista de un bucle de 10 μL .

Para la detección se emplearon dos diseños diferentes de la célula de flujo. En el caso de la *configuración wall-jet*, la salida de la columna se conectó a una célula de flujo Metrohm, modelo EA-1096. Para la *configuración thin-layer*, se conectó la salida de la columna a una célula de flujo para cromatografía líquida de EG&G PARC, modelo MP-1305.

El control de los potenciales, así como el registro de los cromatogramas, se realizó mediante un potencióstato Eco Chemie Autolab PSTAT 10 equipado con software de análisis electroquímico GPES 3.1.

Otros aparatos utilizados han sido: baño de ultrasonidos P-Selecta Ultrasons, centrifugadora P-Selecta Meditronic, rotavapor Heidolph W-2000 y un mezclador Waring con vaso contenedor de vidrio.

II.4.1.2.- Electrodo y células de trabajo

Como electrodos *indicadores* se han utilizado electrodos compósitos de grafito-40% teflón, cuya preparación ha sido ya detallada.

Cuando se utiliza la célula de flujo de tipo "wall-jet", se emplea como soporte electródico un tubo hueco de teflón de 8 cm de longitud y 3.0 mm de diámetro interno, por uno de cuyos extremos se introduce un tornillo de acero de punta plana que permite el contacto eléctrico. Por el otro extremo se introduce pasta de carbono comercial (Metrohm 6.2801.000) para facilitar el contacto eléctrico entre el material compósito y el tornillo. Por último, se introduce a presión el disco de grafito-teflón..

Cuando se trabaja con la célula de flujo de tipo "thin-layer", se utiliza como soporte electródico el electrodo hueco descrito en el apartado II.1.1.1, acoplable a la célula de flujo modelo MP-1305. La cavidad del electrodo se rellena parcialmente con pasta de carbono comercial (Metrohm 6.2801.000) y se introduce a presión el disco de grafito-teflón de 3.0 mm de diámetro.

Los electrodos de grafito-teflón se pretrataron diariamente según se especifica en el apartado II.3.3.2.

La *célula de flujo* de tipo "wall-jet" está equipada con un electrodo de *referencia* de Ag/AgCl/KCl 3M Metrohm Modelo 6.0727.000 y un electrodo *auxiliar* de oro Metrohm Modelo 6.0333.010.

En el caso de la *célula de flujo* de tipo "thin-layer", el electrodo de *referencia* es un electrodo de Ag/AgCl EG&G PARC Modelo P/N 219054.

II.4.2.- REACTIVOS

Se han utilizado los mismos reactivos especificados en el apartado II.2.2. Como disolventes orgánicos se han empleado acetonitrilo y cloroformo (Panreac).

Las *muestras* analizadas han sido manzanas adquiridas en un mercado local.

II.4.3.- PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

II.4.3.1.- Preparación de disoluciones

- *Disoluciones patrón de tiram, disulfiram y fenol*: Se prepararon semanalmente disolviendo las cantidades adecuadas de cada compuesto en 50 mL de acetonitrilo para obtener una concentración final de 2500 mg L⁻¹.

- *Disolución patrón de ziram*: Se prepara disolviendo la cantidad apropiada de fungicida en 100 mL de acetonitrilo para obtener una concentración final de 750 mg L⁻¹.

- *Fase móvil*: Se llevan 25 mL de disolución reguladora H₂PO₄⁻/HPO₄²⁻ 0.2 mol L⁻¹ de pH 7.4 a un matraz de 500 mL y se diluye con agua desionizada. Se añade el volumen necesario de acetonitrilo puro para obtener la composición final tampón fosfato 0.01 mol L⁻¹:acetonitrilo deseada y se enrasa con agua destilada. Una vez preparada, se hace pasar a través de filtros de membrana de nylon de 0.45 µm de diámetro de poro (Whatman).

- *Disoluciones de trabajo*: Se prepararon en un matraz aforado de 5 mL, añadiendo las cantidades apropiadas de cada disolución patrón en acetonitrilo y de acetonitrilo puro hasta el enrase.

Las mezclas que contienen disulfiram, para las cuales es necesario medir el tiempo transcurrido desde la mezcla hasta la inyección, se prepararon de la siguiente forma: en un matraz aforado de 5 mL se enrasa con acetonitrilo y, con ayuda de una micropipeta, se retira un volumen de acetonitrilo igual a la suma de los volúmenes de cada disolución patrón de fungicida o fungicidas que van a ser añadidos al matraz para formar la mezcla. A continuación, se añade la cantidad deseada de tiram y de ziram, se agita la mezcla y se añade el volumen correspondiente de disulfiram, tomando este instante como tiempo cero desde la preparación de la mezcla.

II.4.3.2.- Obtención de los cromatogramas

Se hace circular la fase móvil por el sistema cromatográfico descrito en el apartado II.4.1.1, aumentando la velocidad de flujo de forma progresiva hasta obtener el valor de caudal previamente escogido, 2.0 mL min^{-1} (P: 1400 PSI). Se aplica al electrodo indicador un potencial de +1.0 V vs. Ag/AgCl y se espera el tiempo necesario hasta obtener una corriente de fondo estable. Se inyecta entonces una alícuota de 10 μL de la disolución de trabajo y se registra el cromatograma correspondiente.

II.4.3.3.- Determinación de tiram en muestras de manzanas contaminadas

Aproximadamente 50 g de manzanas troceadas, pesados con exactitud, se introducen en un mezclador y se añaden 50 μL de una disolución patrón de 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de tiram y 125 mL de cloroformo. La mezcla se homogeneiza a 18500 rpm durante 1 minuto y se transfiere a 6 tubos de centrifuga de 35 mL. Se lava varias veces el mezclador con pequeñas porciones de agua destilada, añadiendo las aguas de lavado a los tubos. Después de centrifugar a 4000 rpm durante 10 minutos, se filtra la fase orgánica a través de una placa filtrante de 10-16 μm de diámetro de

poro (N° 4), se transfiere a un matraz de fondo redondo de 250 mL y se evapora el disolvente hasta sequedad en el rotavapor a temperatura ambiente. El residuo se disuelve en 4.5 mL de acetonitrilo con ayuda de agitación ultrasónica, se filtra a través de una membrana de nylon de 0.2 μm de diámetro de poro (Lida) y se recoge en un matraz de 5 mL, enrasando con acetonitrilo. Una alícuota de 10 μL de esta disolución se inyecta en la fase móvil (45:55 acetonitrilo:regulador fosfato 0.01 mol L^{-1} de pH 7.4) y se registra el cromatograma correspondiente. La determinación de tiram se lleva a cabo a partir de un calibrado, en el intervalo 5.0-25.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, obtenido por adición de alícuotas de una disolución patrón del fungicida a una muestra blanco de manzana (sin contaminar) sometida al tratamiento descrito anteriormente.

III.- RESULTADOS Y DISCUSION

III.1.- DETERMINACION VOLTAMPEROMETRICA DE TIRAM Y DISULFIRAM CON UN ELECTRODO DE PASTA DE CARBONO MODIFICADO CON FTALOCIANINA DE COBALTO

Como se ha indicado anteriormente, una de las áreas de utilidad analítica más importante de los electrodos modificados químicamente es aquella en la que se emplean mediadores de transferencia electrónica inmovilizados con el fin de catalizar reacciones electrónicas lentas. Una de las formas más simples de modificar un electrodo con este tipo de materiales con actividad catalítica es mezclándolo íntimamente con pasta de carbono que constituye la propia matriz electródica. El empleo de electrodos de pasta de carbono modificados ha sido revisado recientemente por Kalcher [7,16]. Por otra parte, las ftalocianinas metálicas son, sin lugar a dudas, uno de los tipos de modificadores catalíticos inorgánicos más utilizados, habiendo sido ampliamente empleados con fines analíticos por el grupo de Baldwin [21-30] y por nuestro propio grupo [36,37], con electrodos de pasta de carbono.

En este capítulo se exponen los resultados acerca del empleo de un electrodo de pasta de carbono modificado con el mediador redox ftalocianina de cobalto (CoPC) para llevar a cabo la determinación voltamperométrica de los fungicidas tetrametiltiuramdisulfuro (tiram) y tetraetiltiuramdisulfuro (disulfiram). Varios autores han destacado la idoneidad de la ftalocianina de cobalto como mediador redox en la determinación de compuestos de azufre [22,33,34] por lo que dicha ftalocianina ha sido escogida para este trabajo. Además, se discute la posibilidad de emplear el electrodo de pasta de carbono modificado con CoPC como electrodo indicador en sistemas en flujo.

III.1.1.- ELECCION DE LA FTALOCIANINA METALICA COMO MEDIADOR REDOX

A pesar de que se tienen evidencias de la eficacia de la ftalocianina de cobalto como mediador redox para compuestos con azufre [22,33] se ha procedido, en primer lugar, a verificar si esta ftalocianina metálica es la más apropiada como mediador de transferencia electrónica para la determinación de tiram y disulfiram. Para ello, se registraron voltamperogramas cíclicos de disoluciones de cada uno de los fungicidas sobre electrodos de pasta de carbono modificados con las ftalocianinas metálicas más usuales, de Co(II), de Ni(II) y de Fe(II), así como sobre el electrodo sin modificar.

En las Figuras 4 y 5 se muestran los voltamperogramas obtenidos a pH 7.0 para el tiram (Figura 4) y para el disulfiram (Figura 5). En ambos casos puede apreciarse una disminución de unos 100 mV en el sobrepotencial necesario para la oxidación del fungicida si se emplea un electrodo modificado con un 2% de ftalocianina de cobalto en lugar del electrodo de pasta de carbono sin modificar. Se consigue de esta manera una notable separación de las corrientes de oxidación del tiram y del disulfiram del límite anódico de electroactividad, aspecto éste particularmente interesante en el caso de pretender realizar detección electroquímica (amperométrica) de estos analitos en sistemas en flujo, por ejemplo después de una separación cromatográfica. Además, la intensidad de los picos obtenidos sobre el electrodo modificado con CoPC es aproximadamente un 40% mayor (en términos de relación señal/fondo) que la obtenida con el electrodo de pasta de carbono. Puede observarse asimismo en ambos casos cómo en el barrido inverso no aparece ningún pico de reducción en las condiciones empleadas, lo que es indicativo de la no reversibilidad electroquímica del proceso de oxidación de estos fungicidas.

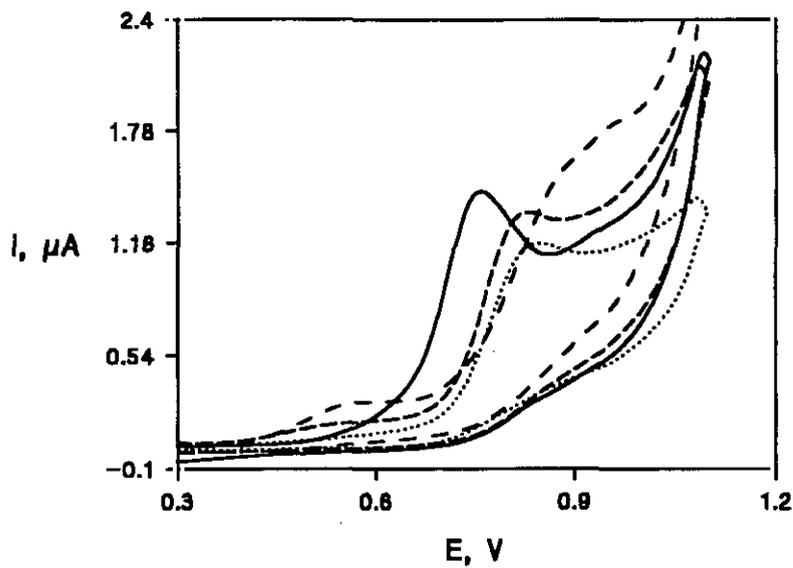


Figura 4

Voltamperogramas cíclicos de tiram 1.0×10^{-5} mol L⁻¹ sobre un electrodo de pasta de carbono modificado con un 2% de ftalocianina de: (—) Co(II), (-----) Ni(II), (- - - -) Fe(II), (.....) electrodo de pasta de carbono sin modificar. Britton-Robinson 0.1 mol L⁻¹, pH 7.0, 2% metanol; $v = 50$ mV s⁻¹.

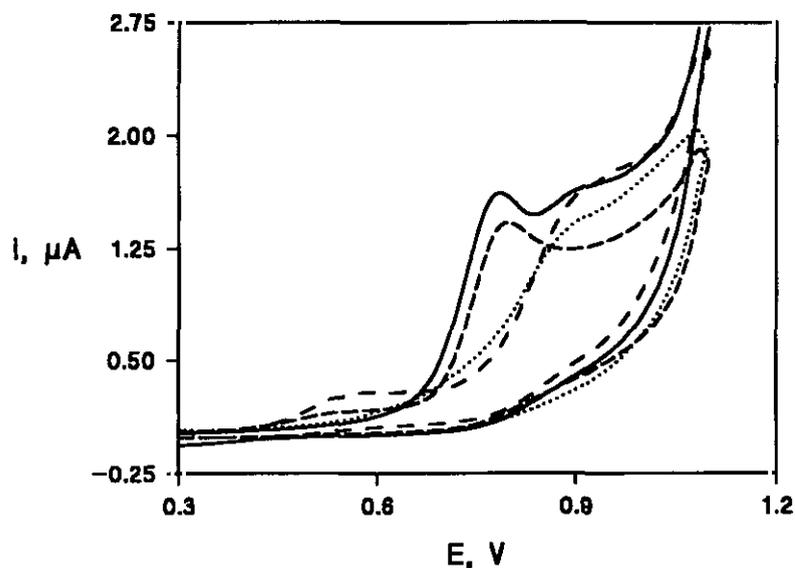


Figura 5

Voltamperogramas cíclicos de disulfiram 1.0×10^{-5} mol L⁻¹ sobre un electrodo de pasta de carbono modificado con un 2% de ftalocianina de (—) Co(II), (-----) Ni(II), (- - - -) Fe(II), (.....) electrodo de pasta de carbono sin modificar. Britton-Robinson 0.1 mol L⁻¹, pH 7.0, 2% metanol; $v = 50$ mV s⁻¹.

También puede observarse en las Figuras 4 y 5 como la ftalocianina de níquel muestra asimismo un efecto catalítico, aunque menos pronunciado que el obtenido con el electrodo modificado con CoPC, mientras que la ftalocianina de hierro no presenta ventaja alguna en su respuesta voltamperométrica para ambos fungicidas.

A la vista de estos resultados se ha elegido la ftalocianina de cobalto como mediador de transferencia electrónica tanto para llevar a cabo la determinación de tiram como de disulfiram.

III.1.2.- COMPORTAMIENTO VOLTAMPEROMETRICO Y OPTIMIZACION DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES MEDIANTE VOLTAMPEROMETRIA DIFERENCIAL DE IMPULSOS

La optimización de las distintas condiciones de trabajo que afectan a la respuesta voltamperométrica del tiram y del disulfiram sobre el electrodo modificado se ha realizado mediante voltamperometría diferencial de impulsos dadas las mejores características de esta técnica, empleando en todos los casos una amplitud del impulso de 50 mV y una velocidad de barrido de potencial de 10 mV s⁻¹.

III.1.2.1.- Influencia de la proporción de modificador

La cantidad de CoPC mezclada con la pasta de carbono se ha optimizado tanto para el tiram como para el disulfiram en tres medios Britton-Robinson 0.1 M de diferente pH: 4.0, 7.0 y 10.0. En el caso del tiram, no se obtuvo ninguna respuesta en oxidación a pH 10.0, mientras que en las Tablas VIII y IX se recogen los resultados obtenidos para una disolución 1.0x10⁻⁵ mol L⁻¹ de fungicida a pH 7.0 y 4.0, respectivamente, cuando el porcentaje de CoPC en la pasta de carbono se varió entre un 0% y un 7% en peso.

Tabla VIII

Influencia de la proporción de CoPC en la pasta de carbono sobre la señal de oxidación de 1.0×10^{-5} mol L⁻¹ de tiram mediante voltamperometría diferencial de impulsos. Britton-Robinson 0.1 mol L⁻¹, pH 7.0, 2% metanol. $\Delta E = 50$ mV; $v = 10$ mV s⁻¹.

% CoPC	i_p (μ A)	E_p (V)
0	0.27	0.752
0.5	0.39	0.706
1	0.41	0.695
2	0.48	0.695
4	0.56	0.700
5	0.52	0.701
7	0.44	0.684

Tabla IX

Influencia de la proporción de CoPC en la pasta de carbono sobre la señal de oxidación de 1.0×10^{-5} mol L⁻¹ de tiram mediante voltamperometría diferencial de impulsos. Britton-Robinson 0.1 mol L⁻¹, pH 4.0, 2% metanol. $\Delta E = 50$ mV; $v = 10$ mV s⁻¹.

% CoPC	i_p (μ A)	E_p (V)
0	0.24	0.788
0.5	0.42	0.746
1	0.44	0.731
2	0.47	0.722
4	0.53	0.724
5	0.45	0.725
7	0.43	0.719

En las Figuras 6 y 7 se muestran algunos de los voltamperogramas registrados a pH 7.0 sobre electrodos modificados con diferentes proporciones de CoPC en presencia (Figura 6) y en ausencia (Figura 7) de tiram. El pico que aparece a aproximadamente 0.7 V en ausencia de tiram se atribuye a la oxidación del Co(II) a Co(III) en la ftalocianina, puesto que aumenta al aumentar la proporción de CoPC en la pasta de carbono y no aparece sobre el electrodo sin modificar. Por otro lado, el aumento exponencial de la corriente que se observa al final del barrido sobre los electrodos modificados, y que no se produce sobre el electrodo sin modificar, se debe a la existencia de un pico a aproximadamente 1.2 V que puede ser asignado a oxidaciones en el anillo de ftalocianina (ventana de la Figura 7).

El pico de oxidación del tiram sobre los electrodos modificados aparece en la misma zona de potencial que el pico correspondiente a la oxidación de Co(II) a Co(III) en la ftalocianina, como era de esperar por tratarse de un proceso de transferencia de carga a través de un mediador redox.

Teniendo en cuenta esta circunstancia, el valor de la intensidad de pico para la oxidación del tiram que aparece en las Tablas VIII y IX se ha medido restando al valor de la intensidad total al potencial de pico, el valor de la corriente de fondo a ese mismo potencial.

Como puede observarse a partir de los datos de la Tabla VIII y la Figura 6, el pico de oxidación del tiram obtenido sobre un electrodo de pasta de carbono modificado, se desplaza unos 50 mV respecto al pico obtenido sobre el electrodo sin modificar. Además, la intensidad de pico aumenta con el contenido de ftalocianina en la pasta hasta una proporción del 4%, disminuyendo ligeramente para proporciones superiores, mientras que el potencial de pico se mantiene prácticamente constante.

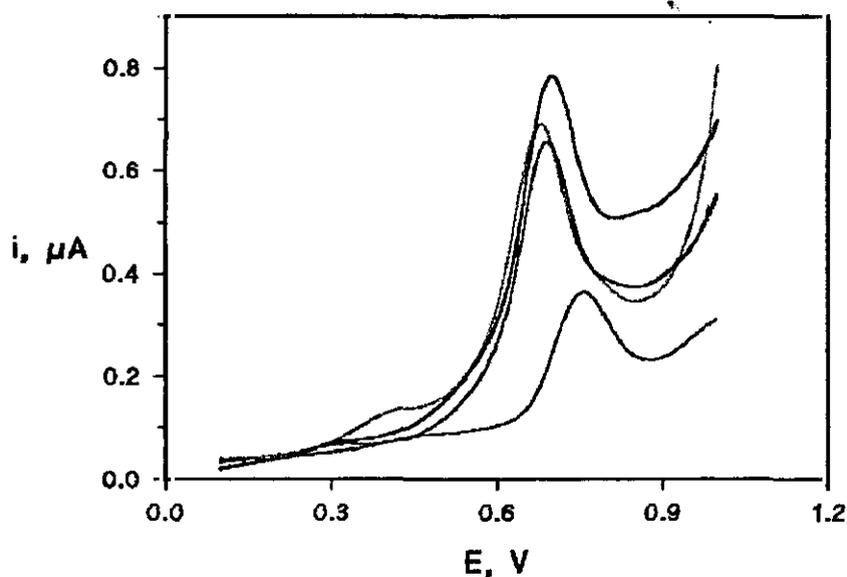


Figura 6

Influencia de la proporción de CoPC en la pasta de carbono sobre la señal de oxidación de 1.0×10^{-5} mol L^{-1} de tiram, mediante voltamperometría diferencial de impulsos. Britton-Robinson 0.1 mol L^{-1} , pH 7.0; $\Delta E = 50$ mV; $v = 10$ mV s^{-1} ; 2% metanol. (—) 0%, (---) 2%, (- - -) 4%, (· · ·) 7% de CoPC.

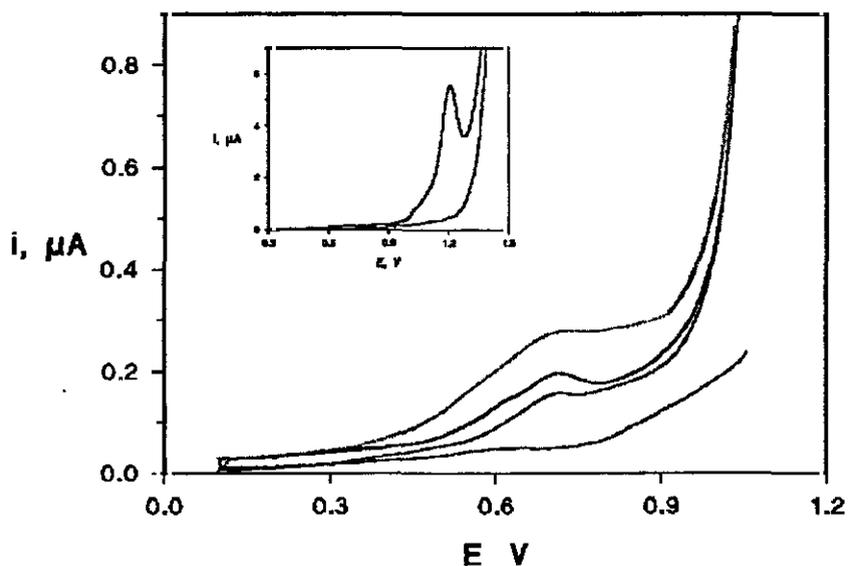


Figura 7

Voltamperogramas, en DPV, de Britton-Robinson 0.1 mol L^{-1} , pH 7.0, 2% metanol, obtenidos con electrodos de pasta de carbono modificados con: (—) 0%, (---) 2%, (- - -) 4%, (· · ·) 7% de CoPC; $\Delta E = 50$ mV; $v = 10$ mV.

Este mismo comportamiento de la intensidad y el potencial del pico de oxidación del tiram con la proporción de CoPC en la pasta de carbono puede observarse cuando el estudio se lleva a cabo a pH 4.0 (Figura 8, Tabla IX).

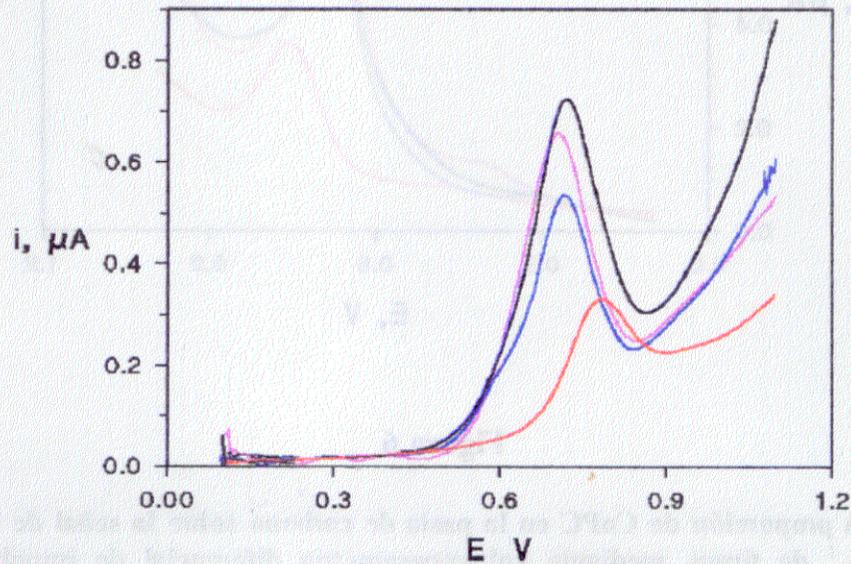


Figura 8

Influencia de la proporción de CoPC en la pasta de carbono sobre la señal de oxidación de tiram 1.0×10^{-5} mol L⁻¹, mediante voltamperometría diferencial de impulsos. Britton-Robinson 0.1 mol L⁻¹, pH 4.0; $\Delta E = 50$ mV; $v = 10$ mV s⁻¹; 2% metanol. (—) 0%, (—) 2% (—) 4%, (—) 7% de CoPC.

En el caso del disulfiram, los resultados a pH 7.0 y 4.0 se recogen en las Tablas X y XI, respectivamente, mientras que los voltamperogramas correspondientes aparecen en las Figuras 9 y 10. En medio Britton-Robinson de pH 7.0, se observa un único pico de oxidación sobre el electrodo de pasta de carbono sin modificar, pero a medida que aumenta el contenido de CoPC en la pasta, su intensidad disminuye al mismo tiempo que va creciendo un segundo pico que aparece a potenciales menos positivos. La altura de ambos picos permanece prácticamente constante a partir del 2% de CoPC en la pasta de carbono.

Tabla X

Influencia de la proporción de CoPC en la pasta de carbono sobre la señal de oxidación de 1.0×10^{-5} mol L⁻¹ de disulfiram mediante voltamperometría diferencial de impulsos. Britton-Robinson 0.1 mol L⁻¹, pH 7.0, 2% metanol. $\Delta E = 50$ mV; $v = 10$ mV s⁻¹.

%CoPC	i_p (μ A) (Primer pico)	i_p (μ A) (Segundo pico)	E_p (V) (Primer pico)	E_p (V) (Segundo pico)
0	-	0.67	-	0.784
0.5	-	0.50	-	0.790
1	0.56	0.47	0.718	0.816
2	0.68	0.44	0.714	0.807
4	0.67	0.44	0.712	0.812
5	0.69	0.50	0.712	0.811
7	0.68	0.48	0.714	0.812

Tabla XI

Influencia de la proporción de CoPC en la pasta de carbono sobre la señal de oxidación de 1.0×10^{-5} mol L⁻¹ de disulfiram mediante voltamperometría diferencial de impulsos. Britton-Robinson 0.1 mol L⁻¹, pH 4.0, 2% metanol. $\Delta E = 50$ mV; $v = 10$ mV s⁻¹.

% CoPC	i_p (μ A)	E_p (V)
0	0.64	0.758
0.5	0.70	0.730
1	0.73	0.733
2	0.75	0.737
4	0.76	0.739
5	0.76	0.739
7	0.74	0.742

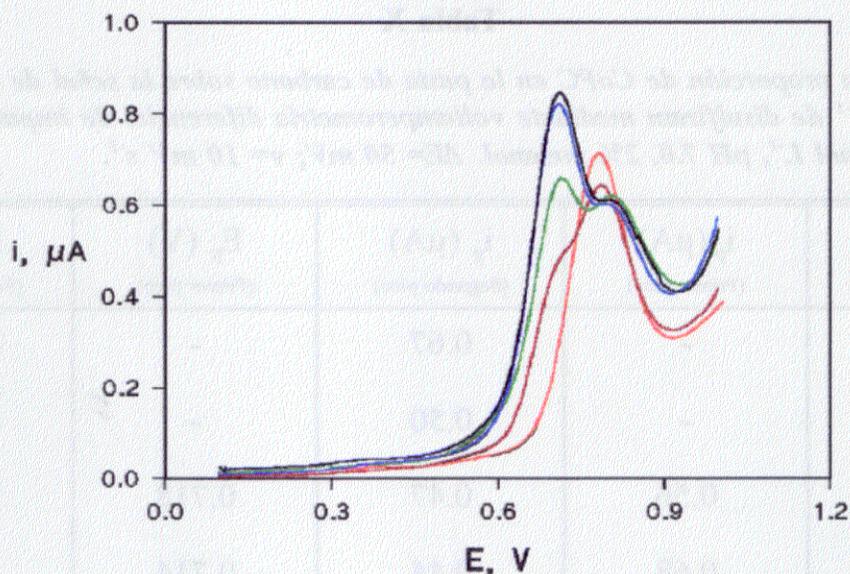


Figura 9

Influencia de la proporción de CoPC en la pasta de carbono sobre la señal de oxidación de 1.0×10^{-5} mol L⁻¹ de disulfiram, mediante voltamperometría diferencial de impulsos. Britton-Robinson 0.1 mol L⁻¹, pH 7.0; $\Delta E = 50$ mV; $v = 10$ mV; 2% metanol. (—) 0%, (—) 0.5%, (—) 1%, (—) 2%, (—) 4% de CoPC.

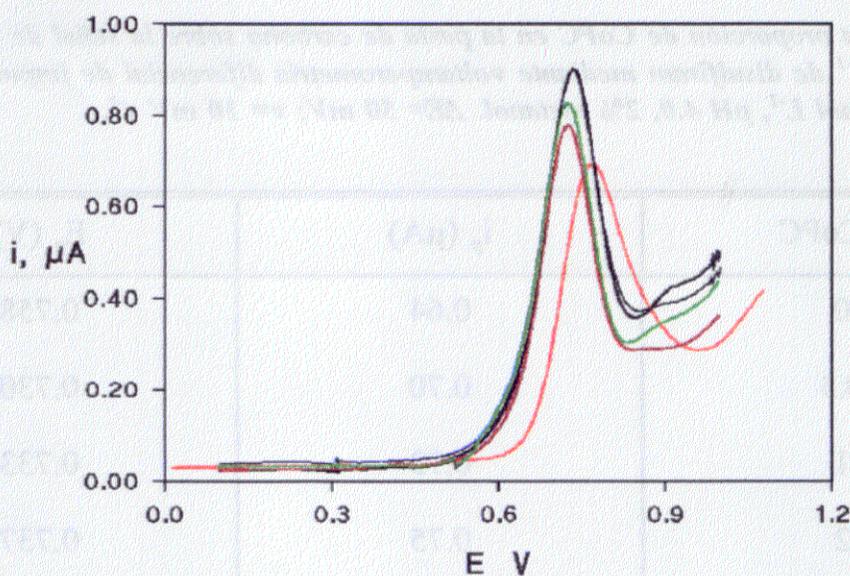


Figura 10

Influencia de la proporción de CoPC en la pasta de carbono sobre la señal de oxidación de 1.0×10^{-5} mol L⁻¹ de disulfiram, mediante voltamperometría diferencial de impulsos. Britton-Robinson 0.1 mol L⁻¹, pH 7.0; $\Delta E = 50$ mV; $v = 10$ mV; 2% metanol. (—) 0%, (—) 0.5%, (—) 1%, (—) 2%, (—) 4% de CoPC.

Puesto que la señal de oxidación del disulfiram aparece también en la zona de potenciales en que se produce la oxidación de Co(II) a Co(III) en la ftalocianina, la intensidad de pico se ha medido respecto al fondo, al igual que en el caso del tiram. Se produce, por tanto, un desplazamiento de la señal de oxidación del disulfiram hacia potenciales menos positivos. Sin embargo, el valor de la intensidad de pico es prácticamente igual sobre el electrodo no modificado y sobre el electrodo modificado con un 2% o más de CoPC.

En medio Britton-Robinson de pH 4.0 aparece un único pico de oxidación en todos los casos. El potencial de pico se desplaza sólo ligeramente con la modificación del electrodo y tampoco es muy marcado el aumento en la intensidad de pico que tiene lugar al aumentar la proporción de CoPC en la pasta. Para proporciones de CoPC superiores al 2% no se observa variación alguna en la intensidad o el potencial de pico.

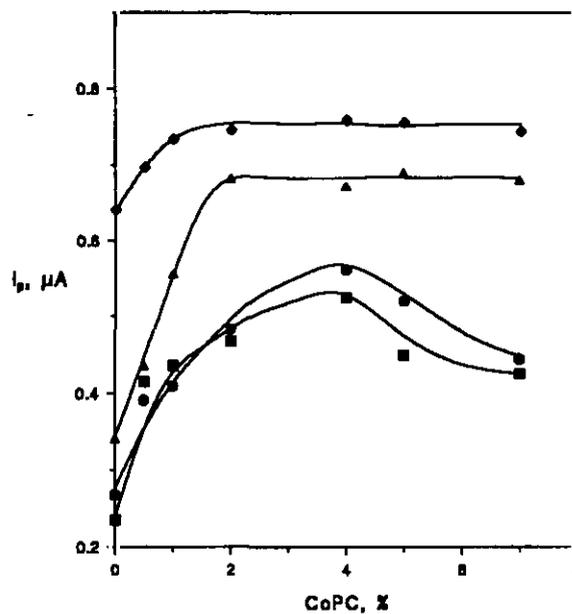


Figura 11

Influencia de la proporción de ftalocianina de cobalto en la pasta de carbono sobre la intensidad de pico de los voltamperogramas, en DPV, de $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de: (●) tiram a pH 7.0, (■) tiram a pH 4.0, (▲) disulfiram a pH 7.0, (◊) disulfiram a pH 4.0. Britton-Robinson 0.1 mol L^{-1} , 2% metanol; $\Delta E = 50 \text{ mV}$; $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$.

Finalmente, a pH 10.0 no se observa ninguna diferencia entre la respuesta con el electrodo modificado y sin modificar.

Todos estos resultados se han resumido en la Figura 11, lo que nos ha conducido a escoger un contenido de CoPC en la pasta de carbono del 4% en el caso del tiram y del 2% en el caso del disulfiram, para llevar a cabo todas las experiencias subsiguientes.

III.1.2.2- Efecto del pH

Se ha estudiado la influencia del pH sobre los valores del potencial de pico y de la intensidad de pico para disoluciones 1.0×10^{-5} mol L⁻¹ de tiram y de disulfiram en medio Britton-Robinson 0.1 mol L⁻¹ con un porcentaje de metanol del 2%. Los valores de pH que se dan a continuación corresponden a valores reales medidos en la disolución de trabajo; los valores de intensidad de pico han sido medidos de base a base, y la anchura de pico se ha calculado a la mitad de esta altura.

En el caso del tiram, se obtienen uno o dos picos de oxidación dependiendo del pH (Figura 12), aunque parece lógico pensar que existen dos picos en todo el intervalo estudiado que se superponen para algunos valores de pH. Por este motivo, la anchura de pico se ha tenido también en cuenta para elegir el valor de pH más apropiado. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla XII y se representan en la Figura 13. El potencial de pico disminuye linealmente ($r= 0.998$ y pendiente - 0.014 V) en todo el intervalo de pH estudiado. La intensidad de pico aumenta al disminuir la acidez del medio hasta pH 6. Para valores de pH superiores, la intensidad permanece constante pero a pH 9 disminuye bruscamente, y el pico desaparece prácticamente para valores de pH mayores. Por otro lado, el valor máximo para la relación $i_p/W_{1/2}$, donde i_p corresponde al pico menos positivo bien

desarrollado y $W_{1/2}$ es la anchura de este pico a mitad de su altura en el caso de aparecer dos picos, se obtiene a pH 8.0. Teniendo en cuenta estos resultados, y con el fin de obtener la mayor sensibilidad y sencillez, se escogió como medio de trabajo para las experiencias subsiguientes una disolución reguladora constituida por $\text{HBO}_2/\text{BO}_2^-$ 0.1 mol L⁻¹ de pH 8.0.

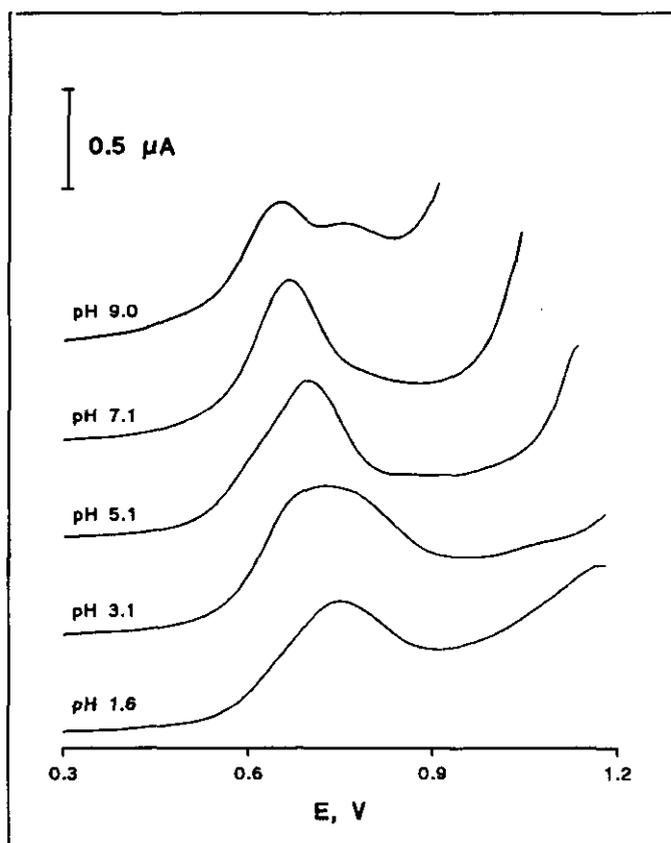


Figura 12

Voltamperogramas, en DPV, de 1.0×10^{-5} mol L⁻¹ de tiram sobre un electrodo de pasta de carbono modificado con un 4% de CoPC a diferentes valores de pH; Britton-Robinson 0.1 mol L⁻¹, 2% metanol, $\Delta E = 50 \text{ mV s}^{-1}$, $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$.

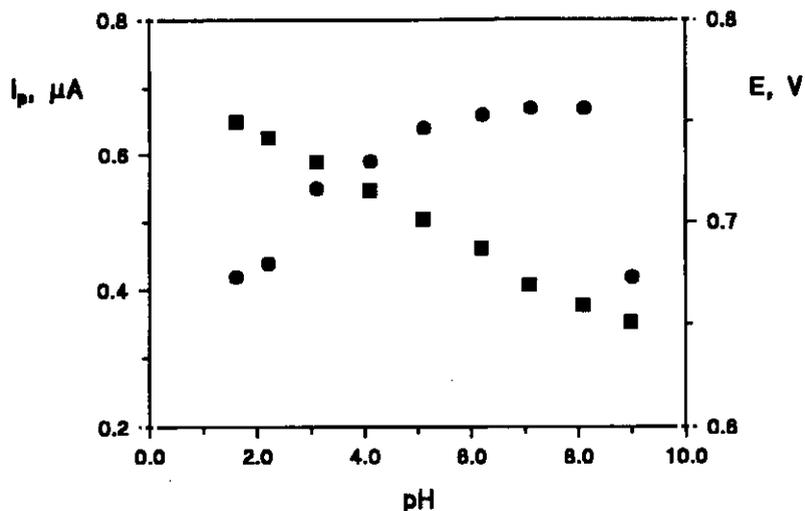


Figura 13

Influencia del pH sobre la i_p y el E_p , en DPV, de 1.0×10^{-5} mol L $^{-1}$ de tiram sobre un electrodo de pasta de carbono modificado con CoPC; Britton-Robinson 0.1 mol L $^{-1}$, 2% metanol; $\Delta E = 50$ mV; $\nu = 10$ mV s $^{-1}$. (■) E_p , (●) i_p .

Tabla XII

Influencia del pH sobre la señal de oxidación, en DPV, de 1.0×10^{-5} mol L $^{-1}$ de tiram sobre un electrodo de pasta de carbono modificado con un 4% de CoPC. Britton-Robinson 0.1 mol L $^{-1}$, 2% metanol; $\Delta E = 50$ mV, $\nu = 10$ mV s $^{-1}$.

pH	E_p , V	i_p , μA	$W_{1/2}$, V	$i_p/W_{1/2}$, $\mu\text{A V}^{-1}$
1.6	0.750	0.42	0.179	2.33
2.2	0.742	0.44	0.175	2.51
3.1	0.730	0.55	0.226	2.43
4.1	0.716	0.59	0.167	3.53
5.1	0.702	0.64	0.142	4.51
6.2	0.688	0.66	0.133	4.96
7.1	0.670	0.67	0.122	5.49
8.1	0.660	0.67	0.113	5.93
9.0	0.652	0.42	0.233	1.80

Por lo que respecta al disulfiram, los resultados de este estudio se recogen en la Tabla XIII y se muestran en las Figuras 14 y 15. En medio ácido, el disulfiram presenta un único pico de oxidación, mientras que a partir de pH 6.0 aparecen dos picos (Figura 14).

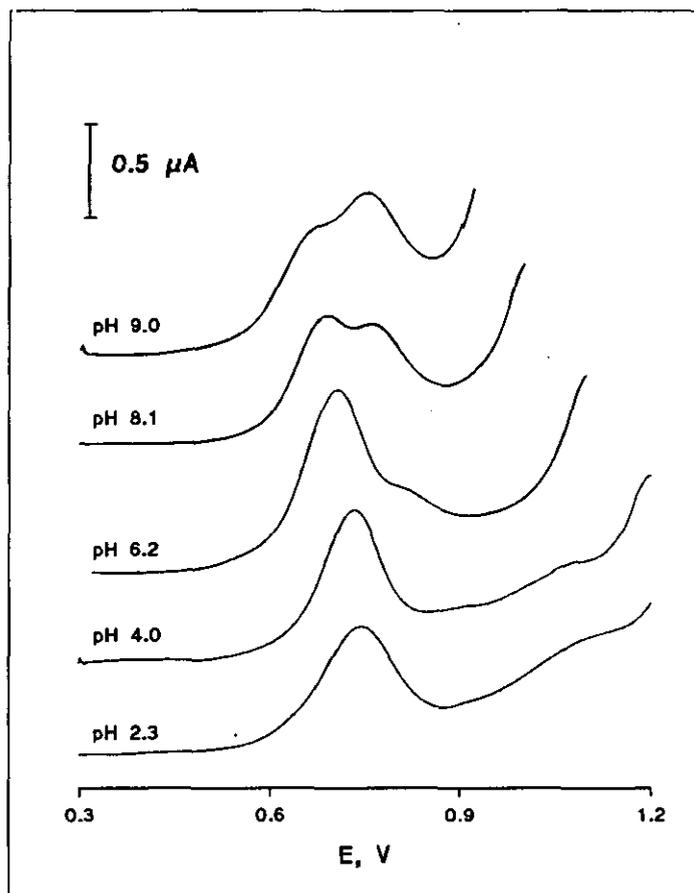


Figura 14

Voltamperogramas, en DPV, de 1.0×10^{-5} mol L⁻¹ de disulfiram sobre un electrodo de pasta de carbono modificado con un 2% de CoPC a diferentes valores de pH; Britton-Robinson 0.1 mol L⁻¹, 2% metanol, $\Delta E = 50$ mV s⁻¹, $v = 10$ mV s⁻¹.

El potencial del primer pico de oxidación, que es también el más intenso hasta pH 8.1, disminuye linealmente ($r=0.998$ y pendiente -0.011 V) al aumentar el pH. La intensidad de pico aumenta linealmente desde pH 2.3 hasta pH 6.2 y disminuye bruscamente al seguir aumentando el pH del medio, al mismo tiempo que crece el pico que se desarrolla a potenciales más positivos. De esta manera, a pH 10.1 se observa solamente este segundo pico; sin embargo, a pH 11.0 no se obtiene ya ninguna señal de oxidación para el disulfiram. También en este caso se ha tenido en cuenta la anchura de pico en los medios donde sólo se observa un pico de oxidación, es decir, desde pH 1.6 hasta pH 6.2. La relación $i_p/W_{1/2}$ es máxima en el medio de pH 6.2. Con objeto de conseguir la mayor sensibilidad y simplicidad, se ha escogido una disolución reguladora constituida por $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ 0.1 mol L^{-1} para llevar a cabo los estudios subsiguientes.

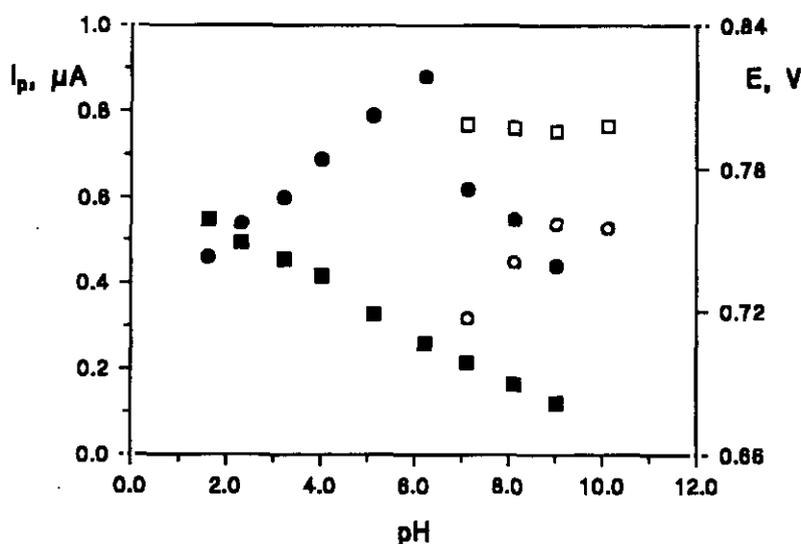


Figura 15

Influencia del pH sobre la i_p y el E_p , en DPV, de 1.0×10^{-5} mol L^{-1} de disulfiram sobre un electrodo de pasta de carbono modificado con CoPC; Britton-Robinson 0.1 mol L^{-1} , 2% metanol; $\Delta E = 50$ mV; $v = 10$ mV s^{-1} . (■) E_{p1} , (●) i_{p1} , (□) E_{p2} , (○) i_{p2} .

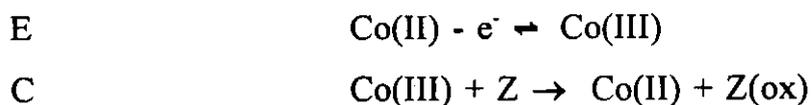
Tabla XIII

Influencia del pH sobre la señal de oxidación, en DPV, de 1.0×10^{-5} mol L⁻¹ de disulfiram sobre un electrodo de pasta de carbono modificado con un 2% de CoPC. Britton-Robinson 0.1 mol L⁻¹, 2% metanol; $\Delta E = 50$ mV, $v = 10$ mV s⁻¹.

pH	E_{p1} , V	i_{p1} , μ A	$W_{1/2(p1)}$ V	$i_{p1}/W_{1/2}$ μ A V ⁻¹	E_{p2} , V	i_{p2} , μ A
1.6	0.759	0.46	0.127	3.62	-	-
2.3	0.749	0.54	0.117	4.61	-	-
3.2	0.742	0.60	0.108	5.55	-	-
4.0	0.735	0.69	0.118	6.27	-	-
5.1	0.719	0.79	0.096	8.23	-	-
6.2	0.707	0.88	0.104	8.46	-	-
7.1	0.699	0.62	-	-	0.771	0.32
8.1	0.690	0.57	-	-	0.764	0.45
9.0	0.682	0.44	-	-	0.755	0.54
10.1	-	-	-	-	0.767	0.53

III.1.3.- CARACTERISTICAS DE LOS PROCESOS DE OXIDACION

Como se ha visto, tanto para el tiram como para el disulfiram se produce un aumento considerable de la intensidad de pico y un desplazamiento del potencial de pico hacia valores menos positivos cuando se emplea el electrodo de pasta de carbono modificado con CoPC en comparación con el electrodo de pasta de carbono sin modificar (Figuras 4 y 5). Además, el pico de oxidación que aparece para ambos fungicidas sobre el electrodo modificado con CoPC, se desarrolla en la zona de potenciales en que se produce la oxidación de Co(II) a Co(III) en la ftalocianina (Figuras 6, 7 y 9). Estos resultados sugieren la existencia de un proceso catalítico de oxidación de tiram o disulfiram que puede esquematizarse como sigue:



Así, el Co(III) formado como resultado de la oxidación electroquímica del Co(II) en la ftalocianina, produce la oxidación química del fungicida (Z), en un proceso redox en el que a su vez se regenera la forma reducida del catalizador (Co(II)). Este mecanismo ha sido propuesto para la oxidación de diversos compuestos orgánicos sobre electrodos modificados con CoPC cuando dicha oxidación se produce en la zona de paso de Co(II) a Co(III) en la ftalocianina [46,47]. En otros casos, parece ser el par Co(II)/Co(I) el que está implicado en el proceso catalítico puesto que la señal de oxidación aparece a potenciales mucho menos positivos [167,168].

Con objeto de investigar más profundamente los procesos electródicos, se ha llevado a cabo un estudio sobre el efecto de la velocidad de barrido de potencial sobre la respuesta electroquímica de los fungicidas mediante voltamperometría de barrido lineal (LSV), con el electrodo modificado de pasta de carbono.

En el caso del tiram, los datos experimentales obtenidos con una disolución $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ se recogen en la Tabla XIV. La representación de la función de corriente $i_p/Cv^{1/2}$ frente al logaritmo de v disminuye fuertemente al aumentar v para velocidades de barrido superiores a 150 mV s^{-1} (Figura 16), lo que resulta característico de un proceso catalítico [169]. Además, el potencial de pico se desplaza hacia valores más positivos al aumentar la velocidad de barrido, hecho que coincide con lo esperado para un mecanismo del tipo EC [170].

En el caso del disulfiram, los resultados experimentales se recogen en la Tabla XV. También en este caso, la función de corriente disminuye al aumentar la velocidad de barrido para velocidades superiores a 80 mV s^{-1} (Figura 17), mientras

que el potencial se desplaza hacia valores más positivos. Estos resultados concuerdan con el mecanismo propuesto para ambos fungicidas.

Tabla XIV

Influencia de la velocidad de barrido de potencial, en LSV, sobre la señal de oxidación de tiram 1.0×10^{-5} mol L⁻¹ sobre un electrodo de pasta de carbono modificado con un 4% de CoPC. HBO₂/BO₂⁻ 0.1 mol L⁻¹, pH 8.0, 2% metanol.

v mV s ⁻¹	log v	i_p , μ A	log i_p	E_p , V	$i_p/Cv^{1/2}$ A mol ⁻¹ mL mV ^{-1/2} s ^{1/2}
5	0.70	0.25	-0.59	0.708	11.2
10	1.00	0.38	-0.42	0.714	12.0
20	1.30	0.58	-0.24	0.729	12.9
40	1.60	0.84	-0.08	0.740	13.2
60	1.78	1.07	-0.03	0.751	13.8
80	1.90	1.28	0.11	0.746	14.3
100	2.00	1.49	0.17	0.746	14.9
150	2.18	1.85	0.27	0.767	15.1
200	2.30	1.99	0.30	0.762	14.1
250	2.40	2.20	0.34	0.770	13.9
500	2.70	2.96	0.47	0.772	13.2
1000	3.00	3.83	0.58	0.788	12.1

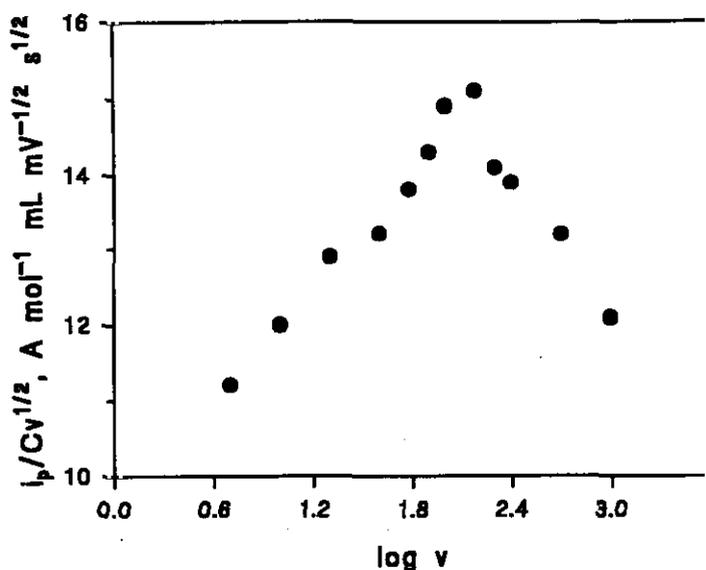


Figura 16

Variación de la función de corriente, $i_p/Cv^{1/2}$, con $\log v$, mediante LSV, empleando un electrodo de pasta de carbono modificado con un 4% de ftalocianina de cobalto. 1.0×10^{-5} mol L^{-1} de tiram; HBO_2/BO_2^- 0.1 mol L^{-1} , pH 8.0, 2% metanol.

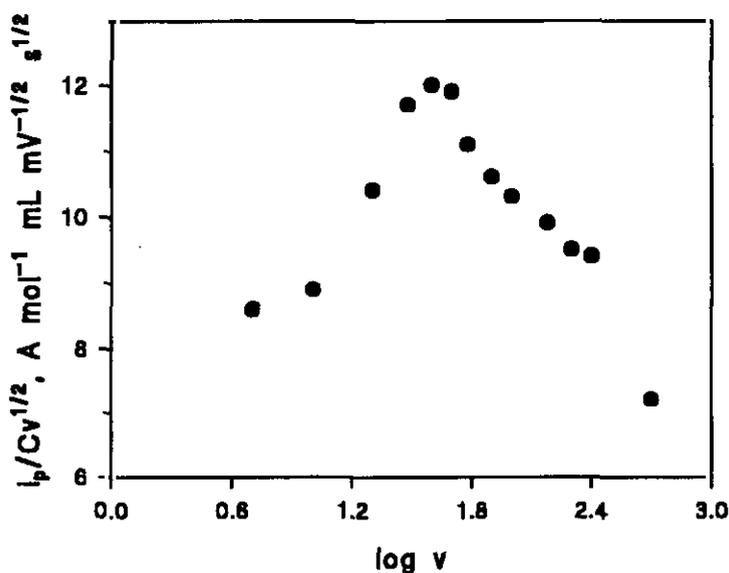


Figura 17

Variación de la función de corriente, $i_p/Cv^{1/2}$, con $\log v$, mediante LSV, empleando un electrodo de pasta de carbono modificado con un 2% de ftalocianina de cobalto. 1.0×10^{-5} mol L^{-1} de disulfiram; $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ 0.1 mol L^{-1} , pH 6.0, 2% metanol.

Tabla XV

Influencia de la velocidad de barrido de potencial, en LSV, sobre la señal de oxidación de disulfiram $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ sobre un electrodo de pasta de carbono modificado con un 2% de CoPC. $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-} 0.1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 6.0, 2% metanol.

v mV s^{-1}	$\log v$	$i_p, \mu\text{A}$	$\log i_p$	E_p, V	$i_p/Cv^{1/2}$ $\text{A mol}^{-1} \text{ mL mV}^{-1/2} \text{ s}^{1/2}$
5	0.70	0.20	-0.70	0.730	8.6
10	1.00	0.28	-0.55	0.748	8.9
20	1.30	0.47	-0.33	0.754	10.4
30	1.48	0.64	-0.19	0.758	11.7
40	1.60	0.76	-0.12	0.764	12.0
50	1.70	0.84	-0.08	0.770	11.9
60	1.78	0.86	-0.06	0.794	11.1
80	1.90	0.95	-0.02	0.784	10.6
100	2.00	1.03	0.02	0.784	10.3
150	2.18	1.21	0.08	0.798	9.9
200	2.30	1.34	0.13	0.802	9.5
250	2.40	1.49	0.17	0.806	9.4
500	2.70	1.61	0.21	0.830	7.2

Por otra parte, la representación del logaritmo de la intensidad de pico frente al logaritmo de la velocidad de barrido es lineal entre 5 y 100 mV s^{-1} en el caso del tiram (Figura 18) y entre 5 y 60 mV s^{-1} en el caso del disulfiram (Figura 19), siendo los valores de las pendientes 0.57 y 0.66 respectivamente, lo que sugiere que inicialmente los procesos están controlados por difusión. Para velocidades

superiores a los valores indicados, se produce, más que una desviación de la linealidad, un cambio en las pendientes, que pasan a ser 0.40 en el caso del tiram y 0.36 para el disulfiram, que podría corresponder a un control por otro tipo de difusión. De hecho, algunos autores sugieren que la superficie del electrodo de pasta de carbono está recubierta por una fina película de aglutinante [16] a través de la cual el analito tiene que difundir para alcanzar la superficie del electrodo. Es decir, el analito debe difundir a través de dos capas de difusión de diferente naturaleza y espesor [18], lo que complicaría el control por difusión de la corriente a velocidades de barrido relativamente elevadas.

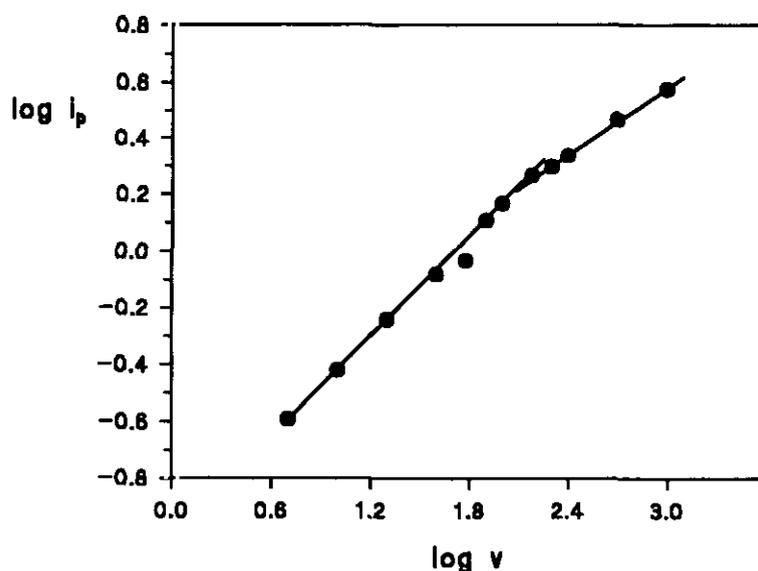


Figura 18

Variación de $\log i_p$ con $\log v$, mediante LSV, empleando un electrodo de pasta de carbono modificado con un 4% de ftalocianina de cobalto. 1.0×10^{-5} mol L⁻¹ de tiram; HBO₂/BO₂⁻ 0.1 mol L⁻¹, pH 8.0, 2% metanol.

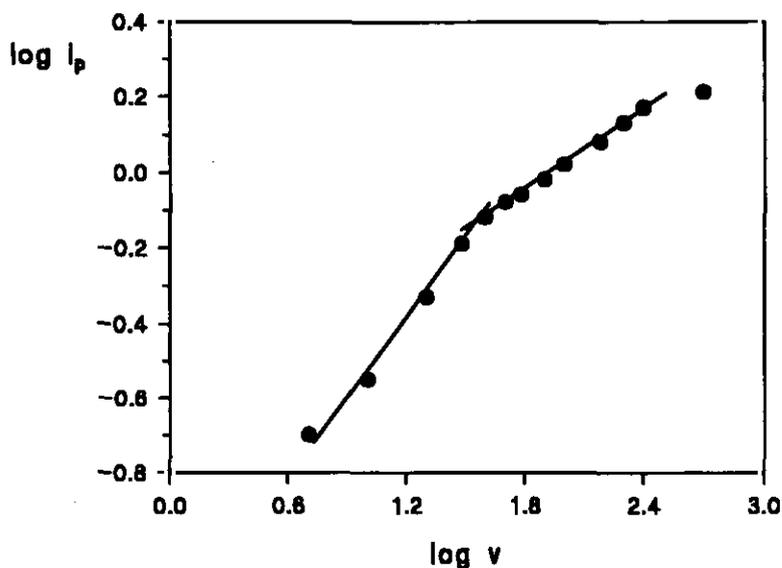


Figura 19

Variación de $\log i_p$ con $\log v$, mediante LSV, empleando un electrodo de pasta de carbono modificado con un 2% de ftalocianina de cobalto. 1.0×10^{-5} mol L⁻¹ de disulfiram; H₂PO₄⁻/HPO₄²⁻ 0.1 mol L⁻¹, pH 6.0, 2% metanol.

III.1.4.- ADSORCION DE LOS FUNGICIDAS SOBRE EL ELECTRODO DE PASTA DE CARBONO MODIFICADO

Como se ha señalado en el Apartado de Introducción, la presencia del aglutinante en la pasta de carbono puede dar lugar a la preconcentración de ciertos analitos a circuito abierto sobre la superficie del electrodo, debido fundamentalmente a fenómenos de extracción [18,19], aunque también pueden darse procesos de adsorción sobre las partículas de grafito [17]. Este efecto puede aprovecharse con fines analíticos si se controla con precisión el proceso de transporte de masa (temperatura y agitación constantes), por lo que se investigó la posibilidad de preconcentrar tiram y disulfiram sobre la superficie del electrodo de pasta de carbono modificado, con objeto de mejorar las características analíticas de la determinación. Para ello, se registraron en primer lugar los voltamperogramas cíclicos de una disolución 1.0×10^{-5} mol L⁻¹ de tiram sin ningún tiempo de acumulación y aplicando

un período de acumulación a circuito abierto de 300 segundos, tanto sobre el electrodo de pasta de carbono modificado con un 4% de CoPC (Figura 20) como sobre el electrodo de pasta de carbono sin modificar (Figura 21).

Sobre el electrodo modificado con ftalocianina se observa claramente un aumento en la intensidad de pico, así como un pequeño desplazamiento del potencial de pico hacia valores más positivos al aplicar el período de acumulación. Sin embargo, sobre el electrodo de pasta de carbono sin modificar el aumento en la intensidad de pico es menos marcado, aunque la señal se desplaza también hacia potenciales más positivos.

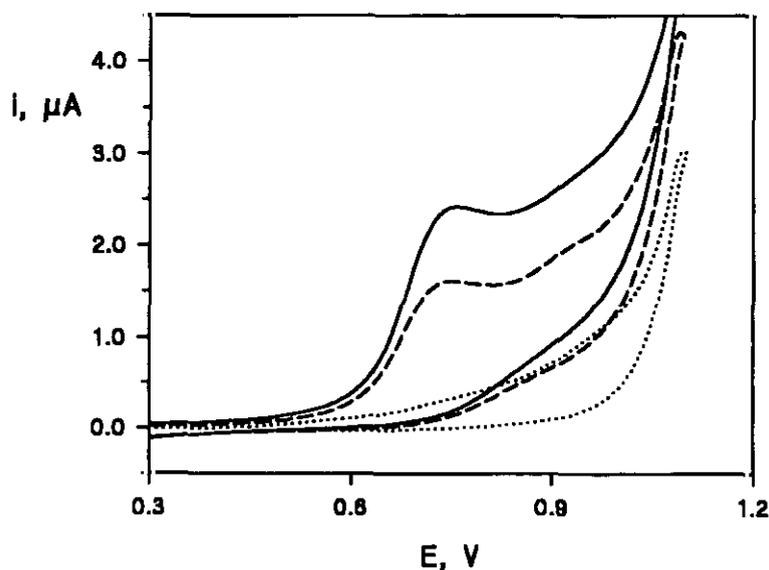


Figura 20

Voltamperogramas cíclicos de tiram $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ sobre un electrodo de pasta de carbono modificado con un 4% de CoPC; $\text{HBO}_2/\text{BO}_2^-$ 0.1 mol L^{-1} , pH 8.0, 2% metanol. (-----) sin acumulación, (—) con un período de acumulación de 300 segundos; (.....) voltamperograma del fondo con un período de acumulación, a circuito abierto, de 300 segundos; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

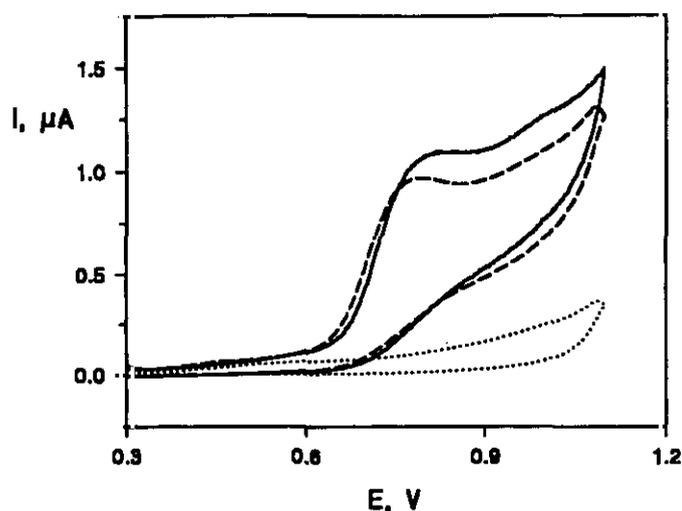


Figura 21

Voltamperogramas cíclicos de tiram $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ sobre un electrodo de pasta de carbono sin modificar; $\text{HBO}_2/\text{BO}_2^-$ 0.1 mol L^{-1} , pH 8.0, 2% metanol. (----) sin acumulación, (—) con un período de acumulación de 300 segundos; (.....) voltamperograma del fondo con un período de acumulación, a circuito abierto, de 300 segundos; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

En el caso del disulfiram, se aprecia mucho más claramente la existencia de fenómenos de adsorción sobre la superficie del electrodo. En la Figura 22 se representan los voltamperogramas cíclicos obtenidos para disulfiram $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de sobre un electrodo de pasta de carbono modificado con un 2% de CoPC. Cuando se emplea un período de acumulación de 300 segundos, la intensidad de pico aumenta considerablemente, desplazándose el potencial de pico hacia valores más positivos. Este mismo efecto puede observarse cuando se emplea el electrodo de pasta de carbono sin modificar (Figura 23), lo que pone de manifiesto que el proceso de acumulación es mucho más acusado en el caso del disulfiram.

Este efecto puede explicarse teniendo en cuenta que el disulfiram es bastante más apolar, más hidrofóbico, que el tiram. En general, las diferencias en la

capacidad de acumulación de los compuestos orgánicos sobre la superficie de los electrodos de pasta de carbono se atribuyen a las diferencias en el carácter hidrofóbico de dichos compuestos, puesto que en el proceso de preconcentración está implicada la afinidad de los analitos por el aglutinante de la pasta de carbono [17-19].

Una vez verificada la posibilidad de preconcentrar ambos fungicidas sobre el electrodo modificado, puede aprovecharse con fines analíticos. Combinando los efectos de preconcentración y electrocatálisis en un mismo electrodo y empleando una rampa de potencial que permita obtener una elevada sensibilidad, como es la voltamperometría diferencial de impulsos, puede esperarse una mejora sustancial de las características analíticas, en términos de sensibilidad, de los métodos desarrollados para la determinación de tiram y disulfiram.

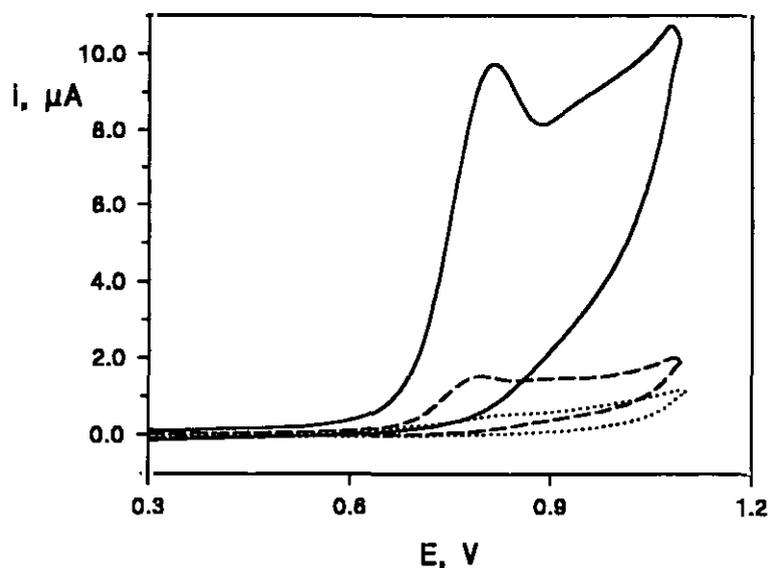


Figura 22

Voltamperogramas cíclicos de disulfiram 1.0×10^{-5} mol L^{-1} sobre un electrodo de pasta de carbono modificado con un 2% de CoPC; $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ 0.1 mol L^{-1} , pH 6.0, 2% metanol. (----) sin acumulación, (—) con un período de acumulación de 300 segundos; (.....) voltamperograma del fondo con un período de acumulación, a circuito abierto, de 300 segundos; $v = 50$ mV s^{-1} .

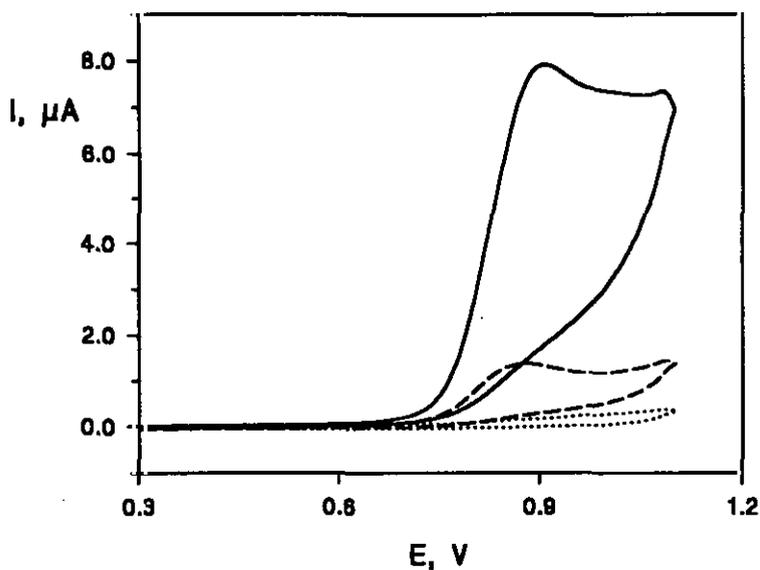


Figura 23

Voltamperogramas cíclicos de disulfiram 1.0×10^{-5} mol L^{-1} sobre un electrodo de pasta de carbono sin modificar; $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ 0.1 mol L^{-1} , pH 6.0, 2% metanol. (-----) sin acumulación, (—) con un período de acumulación de 300 segundos; (.....) voltamperograma del fondo con un período de acumulación, a circuito abierto, de 300 segundos; $v = 50$ mV s^{-1} .

III.1.4.1.- Comportamiento voltamperométrico mediante diferencial de impulsos

El estudio sistemático de las distintas variables experimentales que afectan a la respuesta voltamperométrica se ha llevado a cabo empleando la técnica diferencial de impulsos, con objeto de establecer las condiciones óptimas para el trabajo analítico.

III.1.4.1.1.- Efecto del tiempo de acumulación

La dependencia de la corriente de pico con el período de acumulación a circuito abierto se ha estudiado para ambos fungicidas a dos niveles de concentración, dado que para poder determinar concentraciones más bajas es necesario aumentar el tiempo de preconcentración, mientras que para concentraciones más elevadas se alcanza antes la saturación del electrodo.

Los resultados obtenidos para el tiram se recogen en las Tablas XVI y XVII y se representan en la Figura 24. Para una concentración de tiram de 1.0×10^{-5} mol L^{-1} , la corriente de pico aumenta con el tiempo de acumulación hasta los 60 segundos, manteniéndose prácticamente constante para tiempos más largos, lo que indica la saturación del electrodo. Para una concentración de 1.0×10^{-6} mol L^{-1} de tiram, se observa linealidad hasta los 90 segundos, y la corriente de pico se hace prácticamente constante después de 150 segundos.

Por consiguiente, los períodos de acumulación que se han escogido para estudios posteriores han sido de 90 y 180 segundos, para el nivel superior e inferior de concentración ensayado, respectivamente.

En el caso del disulfiram, la corriente de pico aumenta con el tiempo de acumulación hasta los 300 segundos, manteniéndose constante para tiempos superiores, para los dos niveles de concentración ensayados (Tablas XVIII, XIX y Figura 25). Se ha escogido, por tanto, un tiempo de acumulación de 300 segundos para ambos niveles de concentración.

Tabla XVI

Influencia del tiempo de acumulación a circuito abierto sobre la intensidad del pico de oxidación de tiram $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, en DPV, sobre un electrodo de pasta de carbono modificado con un 4% de CoPC; $\text{HBO}_2/\text{BO}_2^-$; 0.1 mol L^{-1} , pH 8.0, 2% metanol; $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$, $\Delta E = 50 \text{ mV}$.

t, segundos	i_p , μA
0	0.66
30	1.10
60	0.95
90	1.45
120	1.45
150	1.14
300	1.08

Tabla XVII

Influencia del tiempo de acumulación a circuito abierto sobre la intensidad del pico de oxidación de tiram $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, en DPV, sobre un electrodo de pasta de carbono modificado con un 4% de CoPC; $\text{HBO}_2/\text{BO}_2^-$; 0.1 mol L^{-1} , pH 8.0, 2% metanol; $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$, $\Delta E = 50 \text{ mV}$.

t, segundos	i_p , μA
0	0.10
30	0.14
60	0.17
90	0.22
120	0.23
150	0.24
180	0.25
210	0.25

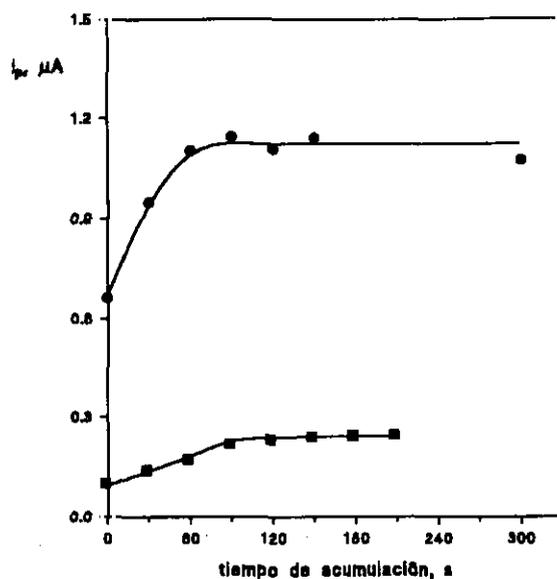


Figura 24

Influencia del tiempo de acumulación sobre la i_p de tiram: (\bullet) $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ y de (\blacksquare) $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, en DPV, sobre un electrodo de pasta de carbono modificado con CoPC; $\text{HBO}_2/\text{BO}_2^-$ 0.1 mol L^{-1} , 2% metanol; $\Delta E = 50 \text{ mV}$; $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$.

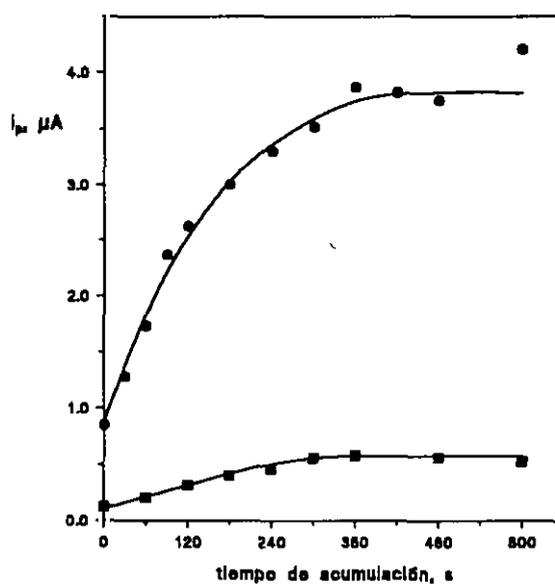


Figura 25

Influencia del tiempo de acumulación sobre la i_p de disulfiram: (\bullet) $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ y de (\blacksquare) $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, en DPV, sobre un electrodo de pasta de carbono modificado con CoPC; $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0.1 mol L^{-1} , 2% metanol; $\Delta E = 50 \text{ mV}$; $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$.

Tabla XVIII

Influencia del tiempo de acumulación a circuito abierto sobre la intensidad del pico de oxidación de disulfiram $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, en DPV, sobre un electrodo de pasta de carbono modificado con un 2% de CoPC; $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0.1 mol L^{-1} , pH 6.0, 2% metanol; $v= 10 \text{ mV s}^{-1}$, $\Delta E= 50 \text{ mV}$.

t, segundos	i_p , μA	t, segundos	i_p , μA
0	0.64	240	2.80
30	1.10	300	2.92
60	1.49	360	3.21
90	1.97	420	3.11
120	2.28	480	2.94
180	2.54	600	3.58

Tabla XIX

Influencia del tiempo de acumulación a circuito abierto sobre la intensidad del pico de oxidación de disulfiram $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, en DPV, sobre un electrodo de pasta de carbono modificado con un 2% de CoPC; $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0.1 mol L^{-1} , pH 6.0, 2% metanol; $v= 10 \text{ mV s}^{-1}$, $\Delta E= 50 \text{ mV}$.

t, segundos	i_p , μA
0	0.11
60	0.20
120	0.31
180	0.40
240	0.46
300	0.56
360	0.58
480	0.56
600	0.53

III.1.4.1.2.- Efecto del pH

La influencia del pH sobre el potencial de pico y la intensidad de pico, cuando se emplea preconcentración de los fungicidas, se ha examinado para una concentración de tiram 1.0×10^{-5} mol L⁻¹, utilizando un electrodo modificado con un 4% de CoPC y un período de acumulación de 90 s a circuito abierto, en medio regulador Britton-Robinson 0.1 mol L⁻¹ con un 2% de metanol, cubriendo el intervalo de pH desde 1.5 hasta 10.0.

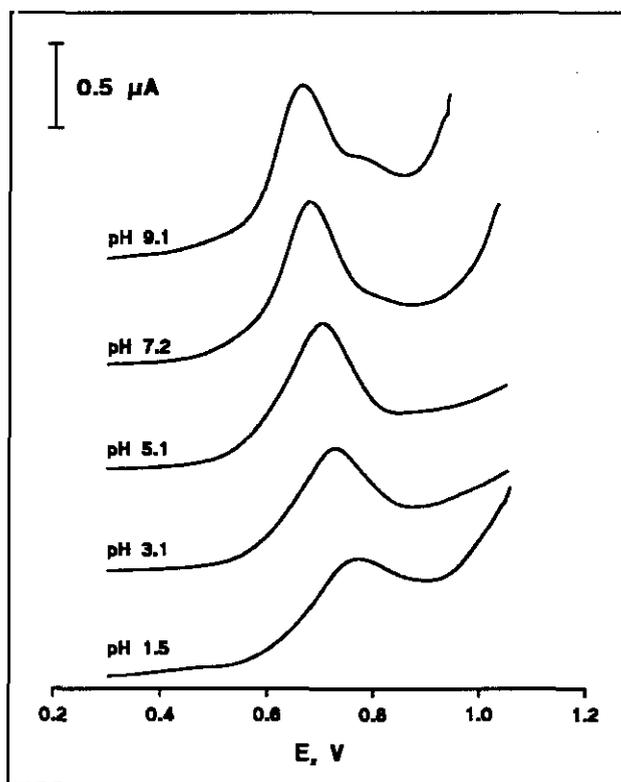


Figura 26

Voltamperogramas, en DPV, de tiram 1.0×10^{-5} mol L⁻¹ sobre un electrodo de pasta de carbono modificado con un 4% de CoPC a diferentes valores de pH; Britton-Robinson 0.1 mol L⁻¹, 2% metanol; tiempo de acumulación: 90 segundos a circuito abierto, $\Delta E = 50$ mV s⁻¹, $v = 10$ mV s⁻¹.

Como puede observarse en la Figura 26, aparece un único pico de oxidación en medio ácido y neutro, que además no muestra indicios de ser el resultado de la superposición de dos picos, como ocurría cuando no se empleaba ningún período de acumulación (Figura 12). En medio ligeramente básico sí se aprecia la presencia de dos picos de oxidación en ambos casos. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla XX y se han representado en la Figura 27.

Tabla XX

Influencia del pH sobre la señal de oxidación, en DPV, de tiram 1.0×10^{-5} mol L⁻¹ sobre un electrodo de pasta de carbono modificado con un 4% de CoPC. Britton-Robinson 0.1 mol L⁻¹, 2% metanol; tiempo de acumulación 90 segundos a circuito abierto. $\Delta E = 50$ mV, $\nu = 10$ mV s⁻¹.

pH	E _p , V	i _p , μA	W _{1/2} , V	i _p /W _{1/2} , μA V ⁻¹
1.5	0.774	0.32	0.184	1.76
2.1	0.743	0.44	0.139	3.17
3.1	0.731	0.51	0.141	3.63
4.1	0.722	0.55	0.134	4.13
5.1	0.704	0.67	0.129	5.17
6.1	0.698	0.73	0.116	6.29
7.2	0.681	0.77	0.112	6.90
8.1	0.679	0.89	0.103	8.76
9.1	0.664	0.77	0.108	7.09

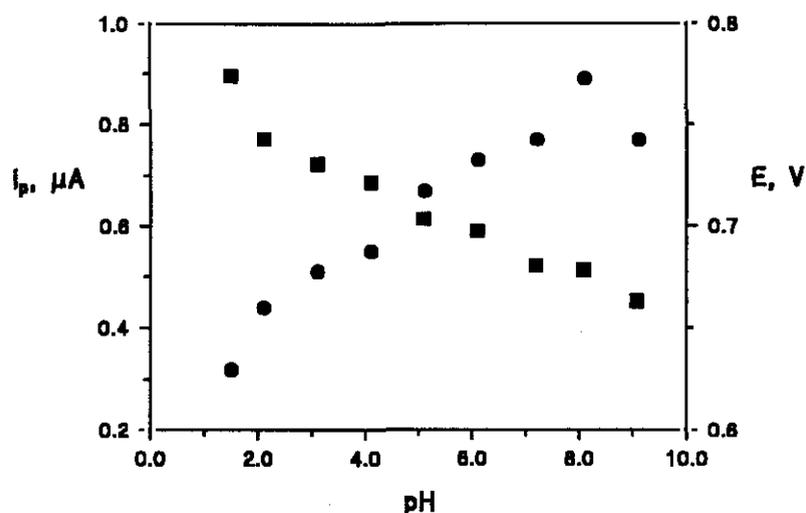


Figura 27

Influencia del pH sobre i_p y E_p , en DPV, de tiram 1.0×10^{-5} mol L⁻¹ sobre un electrodo de pasta de carbono modificado con CoPC; Britton-Robinson 0.1 mol L⁻¹, 2% metanol; tiempo de acumulación: 90 segundos a circuito abierto; $\Delta E = 50$ mV; $v = 10$ mV s⁻¹. (■) E_p , (●) i_p .

El potencial de pico disminuye linealmente desde pH 2.1 hasta pH 9.1 ($r = 0.994$ y pendiente -0.011 V). La intensidad de pico aumenta y la anchura disminuye desde pH 1.5 hasta pH 8.1. Para valores de pH superiores a 9.1, la intensidad disminuye, y por encima de pH 10.0 la señal de oxidación del tiram prácticamente desaparece. La mayor intensidad de pico y la mejor relación $i_p/W_{1/2}$ se obtienen de nuevo a pH 8.1, lo que confirma la idoneidad del medio de trabajo escogido anteriormente constituido por HBO₂/BO₂⁻ 0.1 mol L⁻¹ de pH 8.0 para estudios subsiguientes. A pesar de tratarse de un medio ligeramente alcalino, no se ha observado degradación del fungicida con el tiempo, para los períodos usuales de trabajo en el laboratorio, puesto que la señal analítica obtenida para una disolución de tiram en este medio se mantiene constante al cabo de unas horas de trabajo.

La influencia del pH sobre la señal de oxidación del disulfiram se ha estudiado para una concentración de fungicida $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, utilizando un electrodo modificado con un 2% de CoPC y un período de acumulación de 300 segundos a circuito abierto, en medio Britton-Robinson 0.1 mol L^{-1} con un 2% de metanol. En la Figura 28 se muestran los voltamperogramas obtenidos en algunos de los medios ensayados.

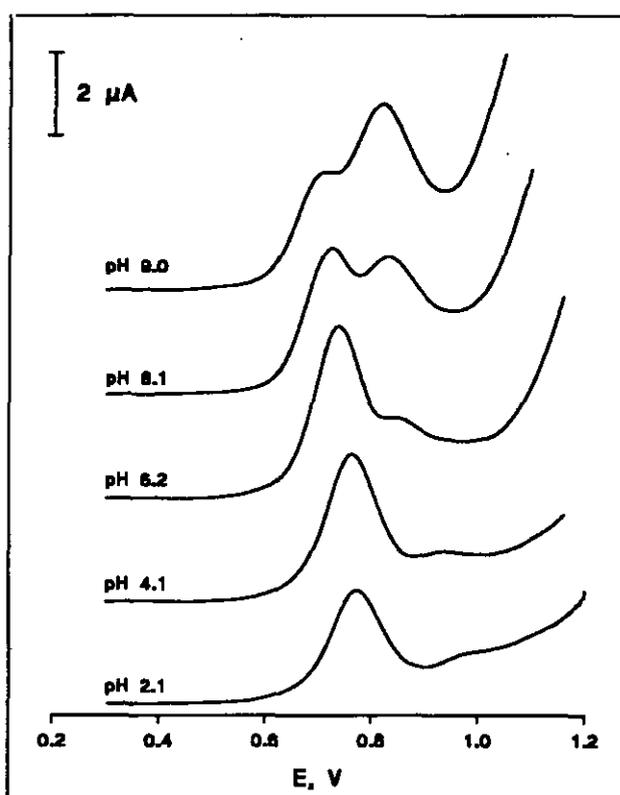


Figura 28

Voltamperogramas, en DPV, de disulfiram $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ sobre un electrodo de pasta de carbono modificado con un 2% de CoPC a diferentes valores de pH; Britton-Robinson 0.1 mol L^{-1} , 2% metanol; tiempo de acumulación: 300 segundos a circuito abierto, $\Delta E = 50 \text{ mV s}^{-1}$, $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$.

Se puede observar la presencia de dos picos de oxidación prácticamente en todo el intervalo de pH estudiado. El que aparece a potenciales más positivos está muy poco desarrollado en medio ácido, pero a medida que el medio se hace más alcalino crece considerablemente, mientras que el pico más interesante desde el punto de vista analítico, ya que aparece en medio ácido a potenciales menos positivos, va disminuyendo al aumentar la alcalinidad del medio y desaparece a pH 10.0. Un efecto similar se observaba sin emplear un período de acumulación (Figura 14). Los datos sobre la influencia del pH sobre el potencial, la intensidad y la anchura de pico se recogen en la Tabla XXI y se representa en la Figura 29.

Tabla XXI

Influencia del pH sobre la señal de oxidación, en DPV, de disulfiram 1.0×10^{-5} mol L⁻¹ sobre un electrodo de pasta de carbono modificado con un 2% de CoPC. Britton-Robinson 0.1 mol L⁻¹, 2% metanol; tiempo de acumulación 300 s a circuito abierto. $\Delta E = 50$ mV, $\nu = 10$ mV s⁻¹.

pH	E_{p1} , V	i_{p1} , μ A	$W_{1/2(p1)}$ V	$i_{p1}/W_{1/2}$ μ A V ⁻¹	E_{p2} , V	i_{p2} , μ A
1.5	0.784	1.80	0.111	16.2	-	-
2.1	0.774	2.32	0.100	22.4	-	-
3.1	0.764	2.79	0.104	26.8	0.958	-
4.1	0.764	3.16	0.103	30.7	0.938	-
5.1	0.758	3.47	0.098	35.4	0.880	-
6.2	0.738	3.70	0.093	39.8	0.853	-
7.2	0.726	3.57	0.108	33.0	0.832	1.32
8.1	0.724	2.87	-	-	0.834	2.04
9.0	0.708	1.96	-	-	0.820	3.03
10.0	-	-	-	-	0.828	3.55
11.1	-	-	-	-	0.822	2.69

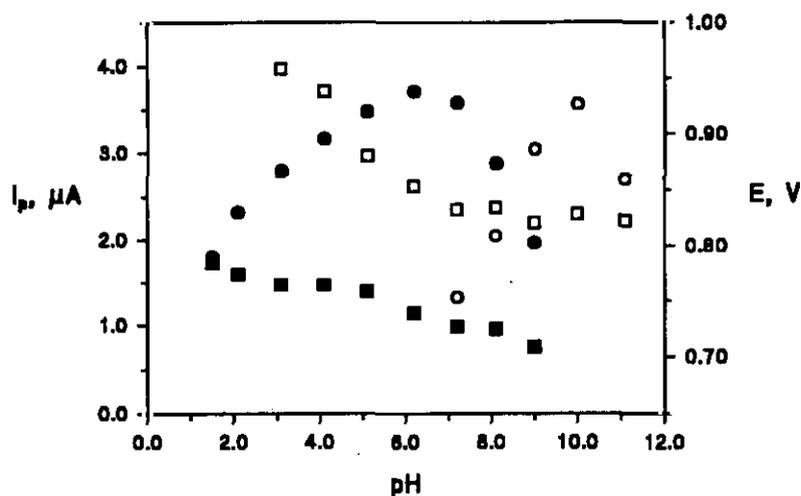


Figura 29

Influencia del pH sobre la i_p y el E_p , en DPV, de disulfiram 1.0×10^{-5} mol L^{-1} sobre un electrodo de pasta de carbono modificado con CoPC; Britton-Robinson 0.1 mol L^{-1} , 2% metanol; tiempo de acumulación: 300 segundos a circuito abierto; $\Delta E = 50$ mV; $v = 10$ mV s^{-1} . (■) E_{p1} , (●) i_{p1} , (□) E_{p2} , (○) i_{p2} .

El potencial de los dos picos de oxidación disminuye en todo el intervalo de pH estudiado. La intensidad del primer pico aumenta y la anchura disminuye al disminuir la acidez del medio hasta pH 6.2, valor al que se obtiene la mayor intensidad y la mejor relación $i_p/W_{1/2}$. A partir de este valor de pH, la intensidad del segundo pico comienza a crecer hasta pH 10.0, para volver a disminuir a partir de pH 11.1. En medio Britton-Robinson de pH 11.9, no se observa ninguna señal de oxidación. También en el caso del disulfiram, el medio de trabajo constituido por regulador fosfato 0.1 mol L^{-1} de pH 6.0 que se había escogido anteriormente, sigue siendo el más apropiado para la determinación de disulfiram tras su acumulación sobre la superficie del electrodo.

III.1.4.1.3.- Efecto del contenido en metanol de la disolución analítica

Debido a la escasa solubilidad de los dos fungicidas estudiados en agua, las disoluciones patrón se han preparado en metanol y, por tanto, las disoluciones de trabajo contienen una pequeña cantidad de este alcohol. La influencia del porcentaje de metanol en el medio de trabajo sobre la respuesta voltamperométrica en diferencial de impulsos de disoluciones de 1.0×10^{-5} mol L⁻¹ de tiram y de disulfiram con el electrodo de pasta de carbono modificado con CoPC se ensayó variando dicho porcentaje entre el 0.4 y el 40% (v/v). Los resultados obtenidos están representados en las Figuras 30 y 31. Puede observarse una fuerte disminución de la intensidad de pico al aumentar la proporción de metanol hasta un 20% para ambos fungicidas. Cuando se empleó un porcentaje del 40% de metanol, se obtuvo una elevada corriente de fondo y ninguna señal asignable a la oxidación del tiram o del disulfiram. Aunque la mayor intensidad de pico se obtuvo en ambos casos para el mínimo porcentaje de metanol, con el fin de asegurar la solubilidad del fungicida en el medio de trabajo, se ha escogido una proporción del 2% de metanol para estudios posteriores tanto para el tiram como para el disulfiram.

III.1.4.1.4.- Conclusiones parciales

A modo de conclusión y con fines comparativos, en las Figuras 32 y 33 se muestran los voltamperogramas obtenidos para una disolución 1.0×10^{-5} mol L⁻¹ de tiram, en diferencial de impulsos, sobre el electrodo de pasta de carbono sin modificar y sobre el electrodo modificado con CoPC, a pH 8.0, sin realizar preconcentración (Figura 32) y empleando un período de acumulación de 90 segundos (Figura 33). En las Figuras 34 y 35 se muestran los voltamperogramas análogos obtenidos para una disolución 1.0×10^{-5} mol L⁻¹ de disulfiram a pH 6.0, sin emplear preconcentración (Figura 34), y tras la aplicación de un período de acumulación de 300 segundos (Figura 35).

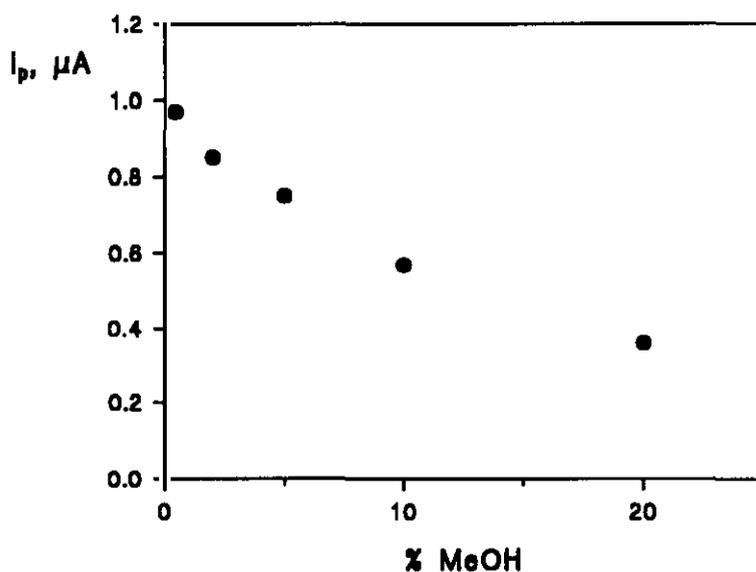


Figura 30

Influencia de la proporción de metanol sobre la intensidad del pico de oxidación, en DPV, de tiram 1.0×10^{-5} mol L^{-1} sobre un electrodo de pasta de carbono modificado con un 4% de CoPC. HBO_2/BO_2^- 0.1 mol L^{-1} , pH 8.0; tiempo de acumulación: 90 segundos a circuito abierto; $\Delta E = 50$ mV; $v = 10$ mV s^{-1} .

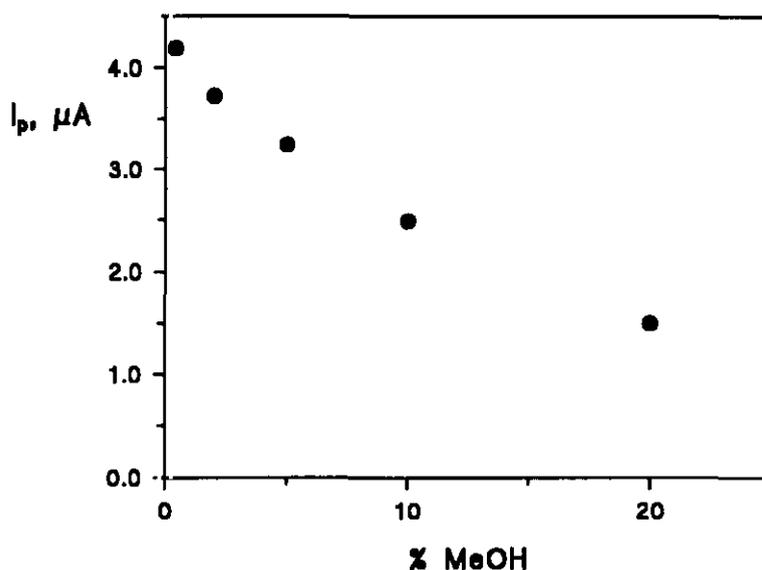


Figura 31

Influencia de la proporción de metanol sobre la intensidad del pico de oxidación, en DPV, de disulfiram 1.0×10^{-5} mol L^{-1} sobre un electrodo de pasta de carbono modificado con un 2% de CoPC. $H_2PO_4^-/PO_4^{2-}$ 0.1 mol L^{-1} , pH 6.0; tiempo de acumulación: 300 segundos a circuito abierto; $\Delta E = 50$ mV; $v = 10$ mV s^{-1} .

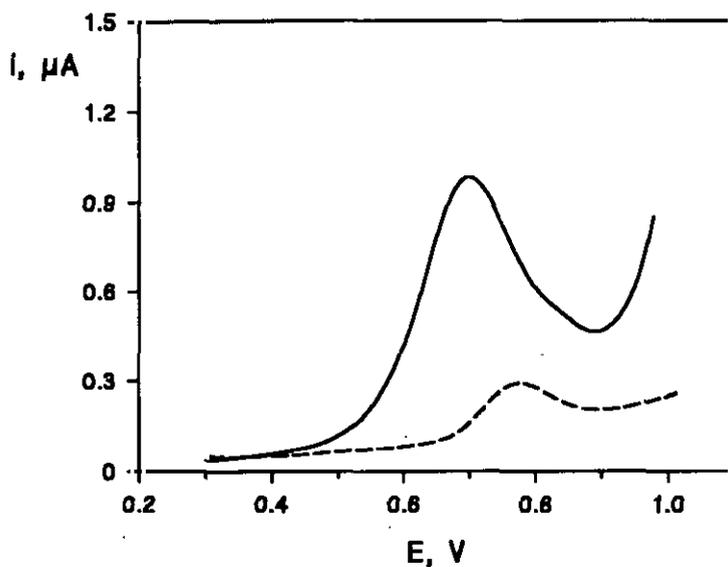


Figura 32

Voltamperogramas, en DPV, de tiram 1.0×10^{-5} mol L⁻¹ sin aplicar período de acumulación sobre: (—) un electrodo de pasta de carbono modificado con un 4% de CoPC, (----) un electrodo de pasta de carbono sin modificar; $\text{HBO}_2/\text{BO}_2^-$ 0.1 mol L⁻¹, pH 8.0, 2% metanol; $\Delta E = 50$ mV, $v = 10$ mV s⁻¹.

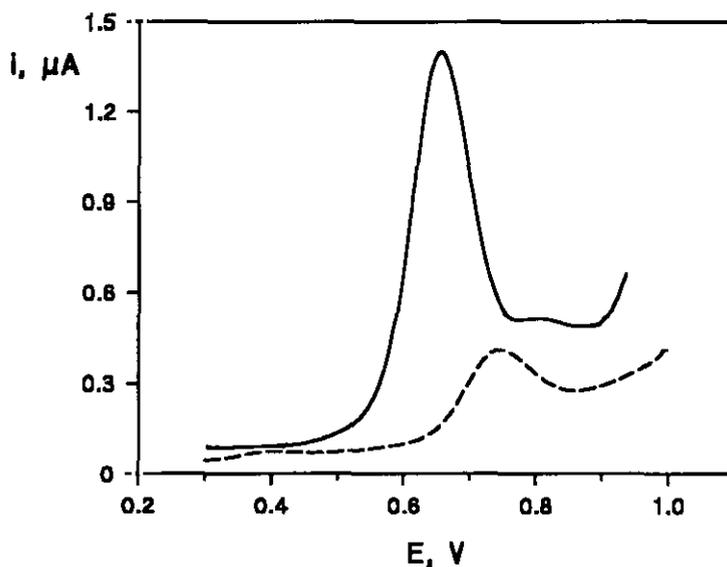


Figura 33

Voltamperogramas, en DPV, de tiram 1.0×10^{-5} mol L⁻¹ tras la aplicación de un período de acumulación de 90 segundos sobre: (—) un electrodo de pasta de carbono modificado con un 4% de CoPC, (----) un electrodo de pasta de carbono sin modificar; $\text{HBO}_2/\text{BO}_2^-$ 0.1 mol L⁻¹, pH 8.0, 2% metanol; $\Delta E = 50$ mV, $v = 10$ mV s⁻¹.

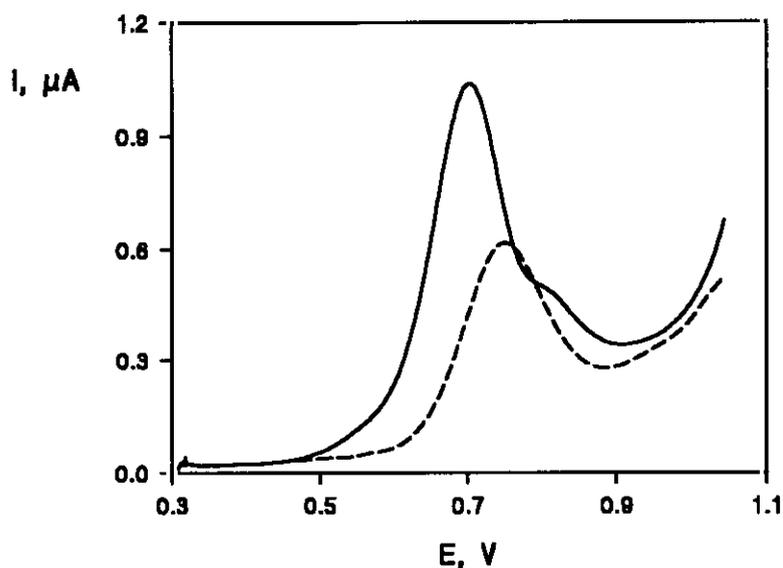


Figura 34

Voltamperogramas, en DPV, de disulfiram 1.0×10^{-5} mol L^{-1} sin emplear ningún período de acumulación sobre: (—) un electrodo de pasta de carbono modificado con un 2% de CoPC, (----) un electrodo de pasta de carbono sin modificar; $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ 0.1 mol L^{-1} , pH 6.0, 2% metanol; $\Delta E = 50$ mV, $v = 10$ mV s^{-1} .

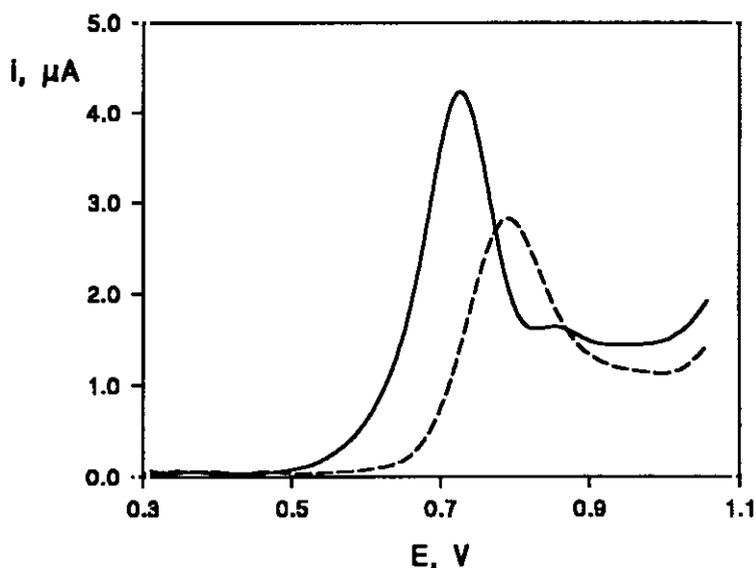


Figura 35

Voltamperogramas, en DPV, de disulfiram 1.0×10^{-5} mol L^{-1} tras la aplicación de un período de acumulación de 300 segundos sobre: (—) un electrodo de pasta de carbono modificado con un 2% de CoPC, (----) un electrodo de pasta de carbono sin modificar; $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ 0.1 mol L^{-1} , pH 6.0, 2% metanol; $\Delta E = 50$ mV, $v = 10$ mV s^{-1} .

Se observa en todos los casos un desplazamiento del potencial de pico hacia potenciales menos positivos y un aumento de la intensidad de pico cuando se trabaja con el electrodo modificado con CoPC (línea continua) respecto al electrodo sin modificar (línea discontinua) lo que, como ya se ha dicho, evidencia la existencia de electrocatálisis. Cuando se emplea un período de acumulación (Figuras 33 y 35) se observa un aumento considerable de la intensidad de pico (obsérvese las diferentes escalas de corriente de las figuras con y sin preconcentración), así como un estrechamiento de los mismos, típico de los procesos de adsorción, con respecto a las señales obtenidas sin emplear preconcentración (Figuras 32 y 34).

Por otra parte, el aumento de corriente que se asocia al efecto catalítico debido a la presencia de CoPC en el electrodo es mucho más acusado en el caso del tiram (Figuras 32 y 33). Por el contrario, el incremento de la señal que se produce en el proceso de acumulación, es claramente más grande en el caso del disulfiram (nótese la diferencia en la escala de intensidades existente entre las Figuras 34 y 35).

III.1.4.2.- Efecto de la velocidad de barrido de potencial mediante voltamperometría de barrido lineal

Finalmente, se ha evaluado la influencia de la velocidad de barrido, empleando la técnica LSV, sobre la corriente de pico y la función de corriente, $i_p/Cv^{1/2}$, tanto para el tiram como para el disulfiram, tras su acumulación sobre el electrodo de pasta de carbono modificado.

En el caso del tiram, se ha utilizado una concentración 1.0×10^{-5} mol L⁻¹ y un período de acumulación de 90 s, recogándose en la Tabla XXII los resultados obtenidos. En el caso del disulfiram, se ha empleado la misma concentración de fungicida y un período de acumulación de 300 s; los resultados se recogen en la Tabla XXIII.

Tabla XXII

Influencia de la velocidad de barrido de potencial, en LSV, sobre la señal de oxidación de tiram 1.0×10^{-5} mol L⁻¹ sobre un electrodo de pasta de carbono modificado con un 4% de CoPC. Tiempo de acumulación: 90 s. HBO₂/BO₂⁻ 0.1 mol L⁻¹, pH 8.0, 2% metanol.

v mV s ⁻¹	log v	i_p , μ A	log i_p	E_p , V	$i_p/Cv^{1/2}$ A mol ⁻¹ mL mV ^{-1/2} s ^{1/2}
5	0.70	0.42	-0.38	0.708	18.7
10	1.00	0.77	-0.11	0.722	24.4
20	1.30	1.22	0.09	0.734	27.3
40	1.60	2.05	0.31	0.742	32.4
60	1.78	2.50	0.40	0.748	32.3
80	1.90	3.13	0.50	0.756	35.0
100	2.00	3.55	0.55	0.758	35.5
150	2.18	4.15	0.62	0.768	33.9
200	2.30	4.97	0.70	0.762	35.1
250	2.40	5.36	0.73	0.780	33.9
500	2.70	6.42	0.81	0.812	28.7
1000	3.00	7.57	0.88	0.826	23.9

Tabla XXIII

Influencia de la velocidad de barrido de potencial, en LSV, sobre la señal de oxidación de disulfiram 1.0×10^{-5} mol L⁻¹ sobre un electrodo de pasta de carbono modificado con un 2% de CoPC. Tiempo de acumulación: 300 s. H₂PO₄⁻/HPO₄²⁻ 0.1 mol L⁻¹, pH 6.0, 2% metanol.

v mV s ⁻¹	log v	i_p , μ A	log i_p	E_p , V	$i_p/Cv^{1/2}$ A mol ⁻¹ mL mV ^{-1/2} s ^{1/2}
5	0.70	2.08	0.32	0.764	93
10	1.00	3.22	0.51	0.774	102
20	1.30	5.03	0.70	0.788	113
40	1.60	8.32	0.92	0.800	131
60	1.78	10.10	1.00	0.802	130
80	1.90	12.37	1.09	0.816	138
100	2.00	13.23	1.12	0.822	132
150	2.18	14.97	1.18	0.836	122
200	2.30	16.48	1.22	0.832	117
250	2.40	18.16	1.26	0.840	115
500	2.70	19.40	1.29	0.854	87

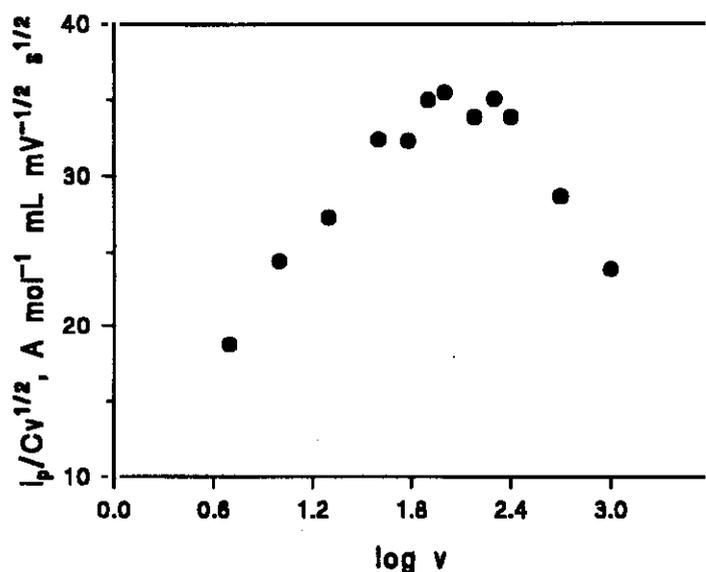


Figura 36

Variación de la función de corriente, $i_p/Cv^{1/2}$, con $\log v$, mediante LSV, empleando un electrodo de pasta de carbono modificado con un 4% de ftalocianina de cobalto. Tiram 1.0×10^{-5} mol L⁻¹; HBO₂/BO₂⁻ 0.1 mol L⁻¹, pH 8.0, 2% metanol. Tiempo de acumulación: 90 segundos.

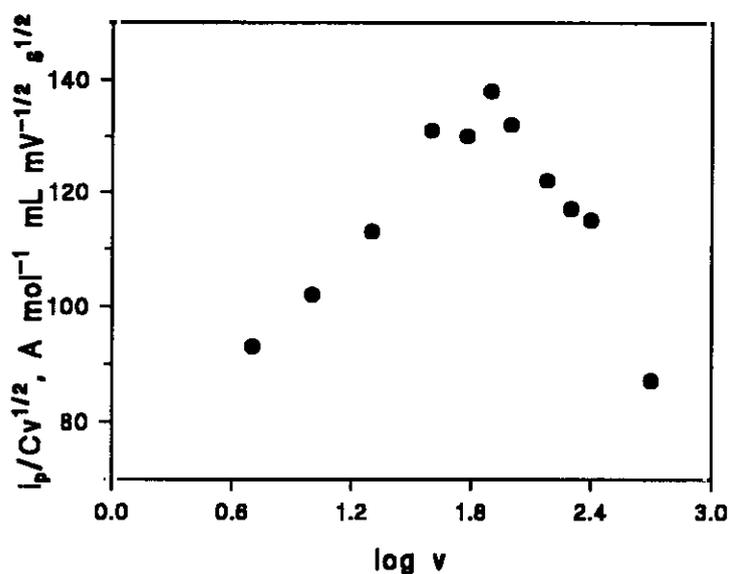
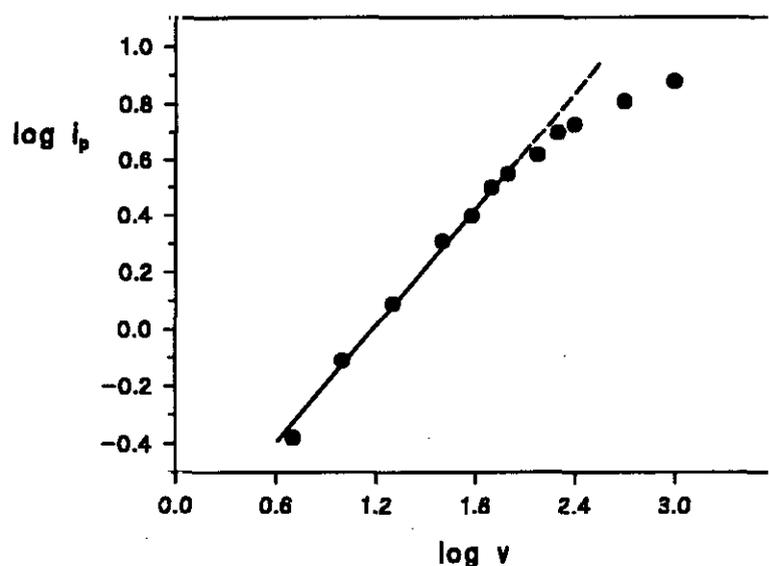
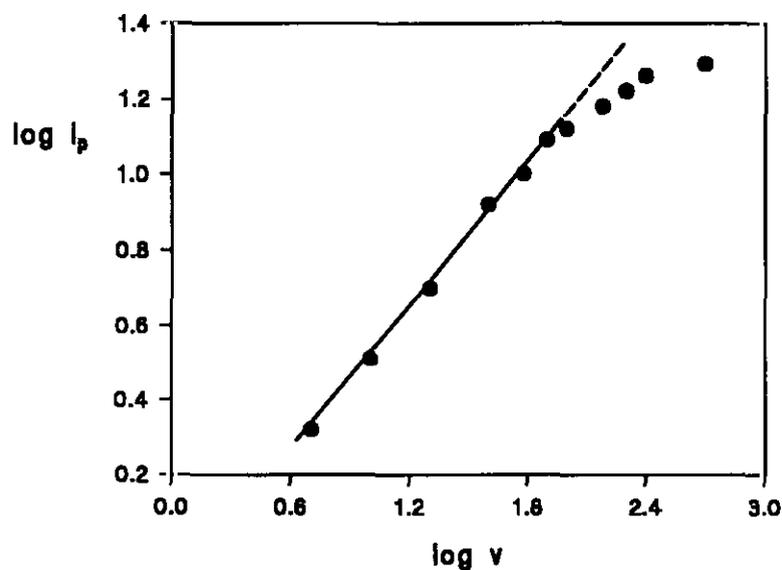


Figura 37

Variación de la función de corriente, $i_p/Cv^{1/2}$, con $\log v$, mediante LSV, empleando un electrodo de pasta de carbono modificado con un 2% de ftalocianina de cobalto. Disulfiram 1.0×10^{-5} mol L⁻¹; H₂PO₄⁻/HPO₄²⁻ 0.1 mol L⁻¹, pH 6.0, 2% metanol. Tiempo de acumulación: 300 segundos.

**Figura 38**

Variación de $\log i_p$ con $\log v$, mediante LSV, empleando un electrodo de pasta de carbono modificado con un 4% de ftalocianina de cobalto. Tiram 1.0×10^{-5} mol L⁻¹; HBO₂/BO₂⁻ 0.1 mol L⁻¹, pH 8.0, 2% metanol. Tiempo de acumulación: 90 segundos.

**Figura 39**

Variación de $\log i_p$ con $\log v$, mediante LSV, empleando un electrodo de pasta de carbono modificado con un 2% de ftalocianina de cobalto. Disulfiram 1.0×10^{-5} mol L⁻¹; H₂PO₄⁻/HPO₄²⁻ 0.1 mol L⁻¹, pH 6.0, 2% metanol. Tiempo de acumulación: 300 segundos.

En ambos casos, la dependencia de la función de corriente con la velocidad de barrido (Figuras 36 y 37) es muy parecida a la observada cuando no se aplicaba un período de preconcentración (Figuras 16 y 17), disminuyendo dicha función para velocidades superiores a 200 mV s^{-1} para el tiram y superiores a 80 mV s^{-1} para el disulfiram, lo que, como se había comentado, resulta característico de los procesos catalíticos.

Sin embargo, la representación de $\log i$ frente a $\log v$, muestra un único tramo recto entre 5 y 100 mV s^{-1} , de pendiente 0.70 ($r= 0.998$) en el caso del tiram (Figura 38) y 0.63 ($r= 0.9990$) en el caso del disulfiram (Figura 39), y se desvía para velocidades superiores. Estos valores de la pendiente parecen indicar un control por difusión de la corriente a bajas velocidades de barrido, cuando deberían encontrarse indicios de la existencia de adsorción. Este efecto puede explicarse si la acumulación del fungicida se produce en mayor grado por extracción en el aglutinante de la pasta de carbono que por adsorción sobre las partículas de grafito [18]. Así, el proceso de oxidación estaría controlado inicialmente por la difusión del analito a través del aglutinante hasta la zona de reacción. Además, de este modo se justifica que la preconcentración sea mucho más acusada en el caso del disulfiram dado su carácter más apolar y, por tanto, su mayor afinidad por el aceite de parafina.

III.1.5.- CURVAS DE CALIBRADO Y CARACTERISTICAS ANALITICAS

Utilizando el período de acumulación apropiado para cada fungicida y para cada nivel de concentración, se han obtenido, empleando voltamperometría diferencial de impulsos en la etapa de redisolución, relaciones lineales entre la intensidad de pico y la concentración de tiram y disulfiram en los intervalos que aparecen recogidos en la Tabla XXIV. Con fines comparativos, se han realizado también calibrados para ambos fungicidas sin emplear ningún período de

acumulación. Los parámetros característicos de todos estos calibrados se recogen en la Tabla XXIV, encontrándose representados en las Figuras 40 a 45.

Como puede observarse, cuando no se aplica preconcentración, las curvas de calibrado se han realizado a partir de 1.0×10^{-6} mol L⁻¹, no siendo posible determinar concentraciones inferiores a ésta para ninguno de los dos fungicidas. Por otra parte, las desviaciones de la linealidad para altas concentraciones, se producen aproximadamente al mismo nivel de concentración realizando o no preconcentración. Si se emplea un mismo período de acumulación para diferentes intervalos de concentración, se observa una disminución en la pendiente al aumentar la concentración de fungicida, característica de los procesos de adsorción. De nuevo se pone de manifiesto que la adsorción es más fuerte en el caso del disulfiram; así, para el intervalo 1.0×10^{-6} - 1.0×10^{-5} mol L⁻¹, la pendiente del calibrado es casi un orden de magnitud mayor cuando se emplea período de acumulación.

Las características analíticas de los métodos así desarrollados se han calculado a partir de los calibrados obtenidos utilizando preconcentración y se encuentran recogidas en la Tabla XXV. Los valores de la desviación estándar relativa se han calculado a partir de las medidas correspondientes a 10 disoluciones diferentes, utilizando 10 electrodos modificados distintos, a dos niveles de concentración, uno de los cuales se encuentra situado en la parte inferior del calibrado correspondiente. Puesto que se han empleado 10 superficies electródicas diferentes, se ha calculado también la desviación estándar relativa de los valores del potencial de pico, resultando ser menor del 1% en todos los casos.

Como criterio para establecer el límite de determinación, se ha utilizado el criterio sugerido por la IUPAC [171], $10s$, habiéndose tomado como estimador de s , el valor de la desviación estándar, en unidades de concentración, obtenido para una concentración próxima a la más baja medida en el calibrado, siendo en este caso de 4.0×10^{-7} mol L⁻¹ para el tiram y de 1.0×10^{-7} mol L⁻¹ para el disulfiram.

Tabla XXIV

Curvas de calibrado para tiram y disulfiram, mediante DPAdSV, empleando un electrodo de pasta de carbono modificado con CoPC. $\Delta E = 50 \text{ mV}$; $\nu = 10 \text{ mV s}^{-1}$.

Fungicida	Tiempo de acumulación, s	Intervalo lineal, mol L ⁻¹	Coefficiente de correlación	Pendiente, $\mu\text{A L mol}^{-1} \times 10^5$	Ordenada en el origen, μA
	0	$1.0 \times 10^{-5} - 6.0 \times 10^{-5}$	0.996	0.65 ± 0.02	0.19 ± 0.09
		$1.0 \times 10^{-6} - 6.0 \times 10^{-5}$	0.998	0.85 ± 0.05	-0.06 ± 0.03
Tiram	90	$1.0 \times 10^{-5} - 7.0 \times 10^{-5}$	0.997	0.60 ± 0.06	0.5 ± 0.2
	180	$1.0 \times 10^{-6} - 1.0 \times 10^{-5}$	0.9994	1.02 ± 0.03	0.03 ± 0.02
		$3.0 \times 10^{-7} - 1.0 \times 10^{-6}$	0.993	1.67 ± 0.06	-0.011 ± 0.005
Disulfiram	0	$1.0 \times 10^{-6} - 2.0 \times 10^{-5}$	0.997	0.57 ± 0.04	0.00 ± 0.02
	300	$1.0 \times 10^{-5} - 2.0 \times 10^{-5}$	0.9998	3.4 ± 0.7	0.4 ± 1.0
		$1.0 \times 10^{-6} - 1.0 \times 10^{-5}$	0.9995	4.2 ± 0.1	0.13 ± 0.07
		$8.0 \times 10^{-8} - 1.0 \times 10^{-6}$	0.9995	4.8 ± 0.1	0.061 ± 0.006

Por lo que respecta al límite de detección, se ha calculado a partir de la expresión $3s_b/m$ [172], donde m es la pendiente del calibrado inferior considerado y como estimador de s_b se ha tomado el valor de la desviación estándar de la señal para 10 disoluciones de tiram $4.0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ y de disulfiram $1.0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$.

Como se puso de manifiesto en el apartado de antecedentes bibliográficos, la mayoría de los métodos electroquímicos que se han encontrado para la

determinación de tiram y disulfiram están basados en la reducción de los fungicidas sobre electrodos de mercurio o de película de mercurio, oscilando los límites de detección entre 1.0×10^{-6} mol L⁻¹ [151] y 1.3×10^{-10} mol L⁻¹ [153]. El único método encontrado basado en la oxidación de tiram tras su acumulación sobre un electrodo rotatorio de platino reporta un límite de detección de 0.3 ng mL⁻¹ (1.3×10^{-9} mol L⁻¹), pero presenta claras desventajas puesto que el pico de oxidación se encuentra situado en la barrera de oxidación del medio (aproximadamente a 1.5 V) y es necesario un período de acumulación de 10 minutos [1]. Puede decirse, por consiguiente, que los métodos desarrollados utilizando el electrodo de pasta de carbono modificado con CoPC resultan ventajosos en términos de sensibilidad, potencial al que aparecen las respuestas (mayor selectividad) y rapidez con respecto a los métodos precedentes.

Tabla XXV

Características analíticas de los métodos desarrollados para la determinación de tiram y disulfiram, mediante DPAdSV, empleando un electrodo de pasta de carbono modificado con ftalocianina de cobalto. $\Delta E = 50$ mV; $v = 10$ mV s⁻¹. Tiempo de acumulación: Tiram: 180 segundos, disulfiram: 300 segundos.

Fungicida	RSD, %	Límite de determinación, mol L ⁻¹	Límite de detección, mol L ⁻¹
Tiram	3.0 ^a 6.0 ^b	2.4×10^{-7}	7.1×10^{-8}
Disulfiram	3.1 ^a 7.2 ^c	7.3×10^{-8}	2.2×10^{-8}

a) Nivel de concentración: 5.0×10^{-6} mol L⁻¹ (n=10)

b) Nivel de concentración: 4.0×10^{-7} mol L⁻¹ (n=10)

c) Nivel de concentración: 1.0×10^{-7} mol L⁻¹ (n=10)

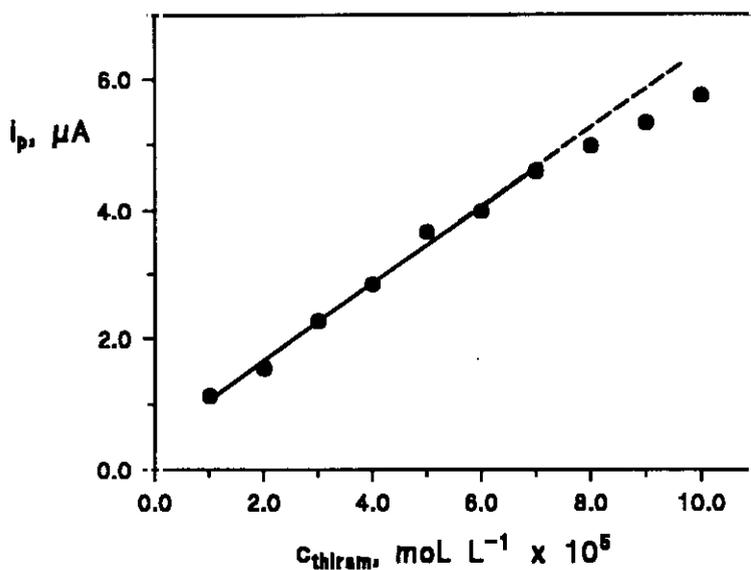


Figura 40

Influencia de la concentración de tiram sobre la intensidad de pico, i_p , mediante DPAdSV, empleando un electrodo de pasta de carbono modificado con un 4% de ftalocianina de cobalto. Intervalo de concentración: de 1.0×10^{-5} a 10.0×10^{-5} mol L^{-1} de tiram; $\text{HBO}_2/\text{BO}_2^-$ 0.1 mol L^{-1} , pH 8.0, 2% metanol. Tiempo de acumulación: 90 segundos.

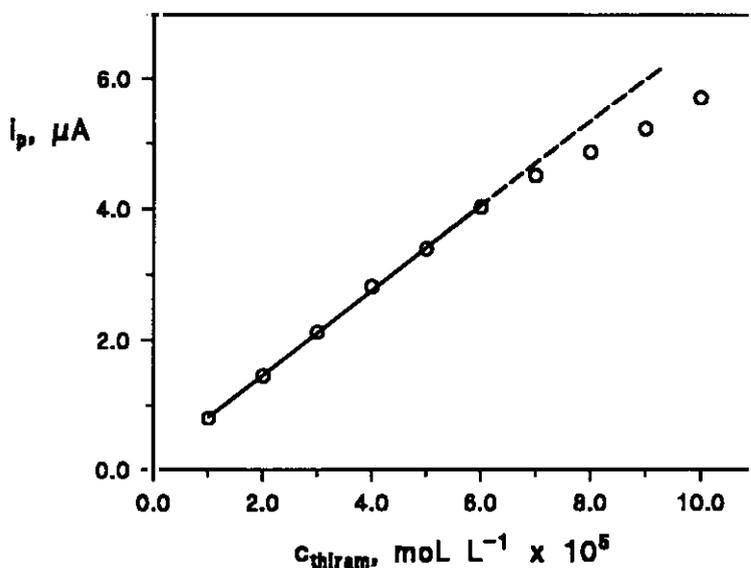


Figura 41

Influencia de la concentración de tiram sobre la intensidad de pico, i_p , mediante DPAdSV, empleando un electrodo de pasta de carbono modificado con un 4% de ftalocianina de cobalto. Intervalo de concentración: de 1.0×10^{-5} a 10.0×10^{-5} mol L^{-1} de tiram; $\text{HBO}_2/\text{BO}_2^-$ 0.1 mol L^{-1} , pH 8.0, 2% metanol. Sin período de acumulación.

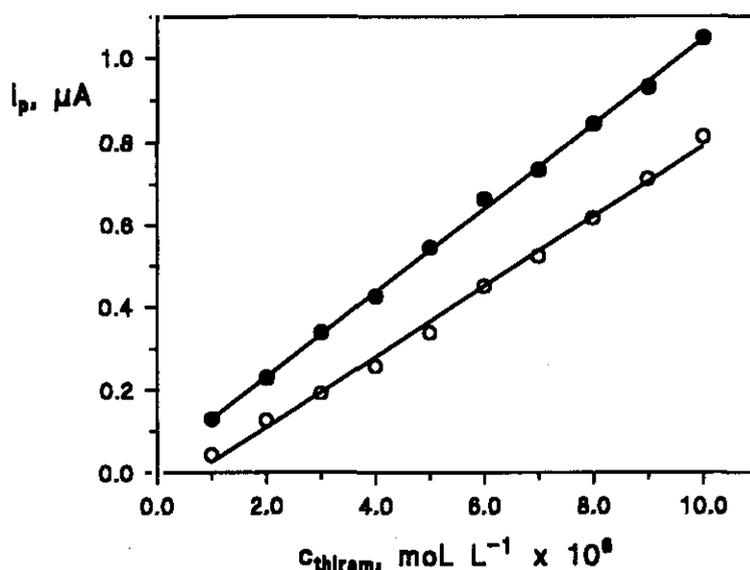


Figura 42

Influencia de la concentración de tiram sobre la intensidad de pico, i_p , mediante DPAdSV, empleando un electrodo de pasta de carbono modificado con un 4% de ftalocianina de cobalto. Intervalo de concentración: de 1.0×10^{-6} a 10.0×10^{-6} mol L^{-1} de tiram; HBO_2/BO_2^- 0.1 mol L^{-1} , pH 8.0, 2% metanol. (●) empleando un período de acumulación de 180 segundos; (○) sin período de acumulación.

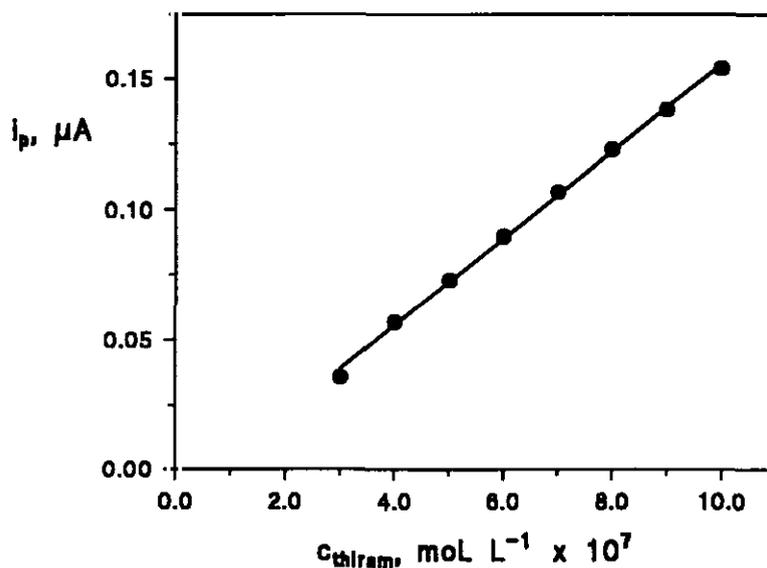


Figura 43

Influencia de la concentración de tiram sobre la intensidad de pico, i_p , mediante DPAdSV, empleando un electrodo de pasta de carbono modificado con un 4% de ftalocianina de cobalto. Intervalo de concentración: de 3.0×10^{-7} a 10.0×10^{-7} mol L^{-1} de tiram; HBO_2/BO_2^- 0.1 mol L^{-1} , pH 8.0, 2% metanol. Tiempo de acumulación: 180 segundos.

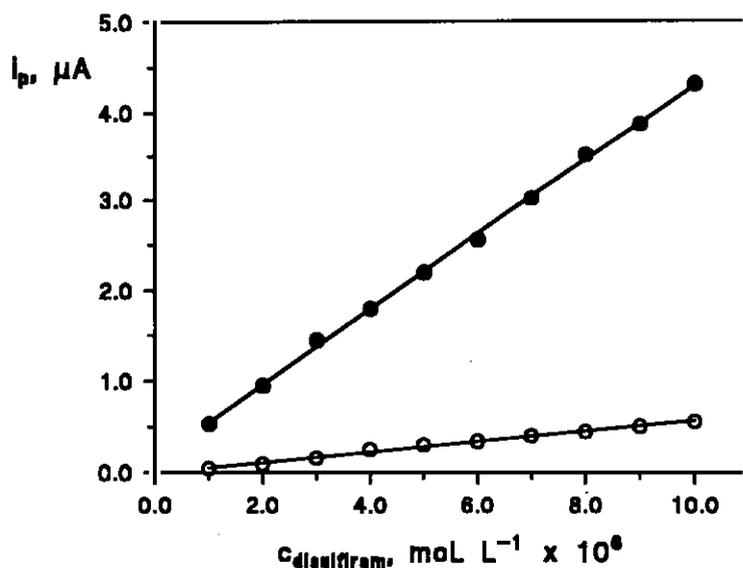


Figura 44

Influencia de la concentración de disulfiram sobre la intensidad de pico, i_p , mediante DPAdSV, empleando un electrodo de pasta de carbono modificado con un 2% de ftalocianina de cobalto. Intervalo de concentración: de 1.0×10^{-6} a 10.0×10^{-6} mol L^{-1} de disulfiram; $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0.1 mol L^{-1} , pH 6.0, 2% metanol. (●) empleando un período de acumulación de 300 segundos; (○) sin período de acumulación.

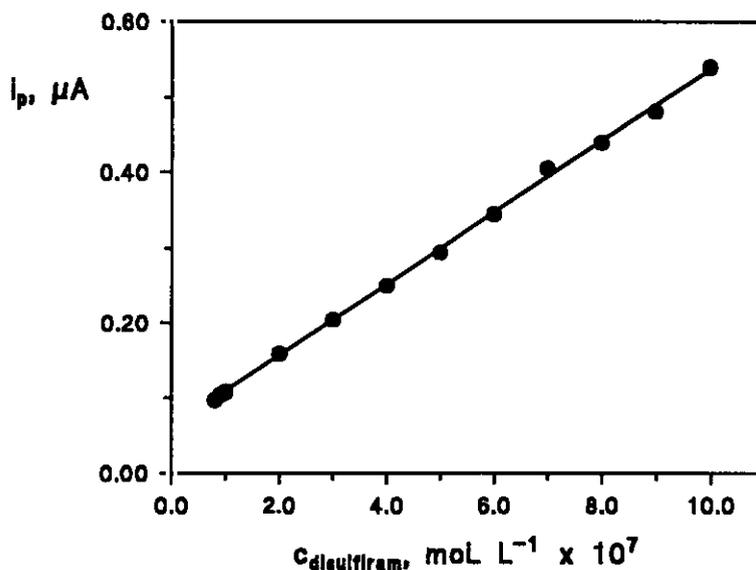


Figura 45

Influencia de la concentración de disulfiram sobre la intensidad de pico, i_p , mediante DPAdSV, empleando un electrodo de pasta de carbono modificado con un 2% de ftalocianina de cobalto. Intervalo de concentración: de 0.8×10^{-7} a 10.0×10^{-7} mol L^{-1} de disulfiram; $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0.1 mol L^{-1} , pH 6.0, 2% metanol.

III.1.6.- ESTUDIO DE INTERFERENCIAS

Una vez establecidas las características analíticas de los métodos desarrollados para determinar los fungicidas tiram y disulfiram con el electrodo de pasta de carbono modificado con CoPC, se procedió a realizar estudios de interferencias utilizando voltamperometría diferencial de impulsos en la etapa de redisolución tras aplicar el correspondiente período de acumulación. Así, se comprobó el efecto que ejerce la presencia de ciertas sustancias que pueden encontrarse junto con estos fungicidas en diferentes tipos de muestras (aguas, alimentos, etc.), sobre la señal voltamperométrica de oxidación del tiram o del disulfiram en concentración 2.0×10^{-6} mol L⁻¹ con el electrodo modificado.

Las sustancias ensayadas han sido: N,N-dimetilditiocarbamato de zinc (ziram), que también se utiliza como fungicida y pertenece a la familia de los ditiocarbamatos, fenol y un catión metálico capaz de formar complejos con este tipo de sustancias como es el Zn(II). También se ha evaluado la influencia de la presencia de tiram sobre la señal de oxidación del disulfiram (con un período de acumulación de 300 s) y viceversa (con tiempo de acumulación de 180 s).

En las condiciones experimentales utilizadas para la determinación de tiram y de disulfiram, el Zn(II) obviamente no presenta ningún pico de oxidación, mientras que, como se observa en las Figuras 46 y 47, tanto el fenol como el ziram en determinada concentración, muestran picos de oxidación bien definidos en el intervalo de potenciales barrido. La proximidad de los potenciales de pico de tiram, ziram y disulfiram da lugar a que sólo aparezca un pico global de oxidación cuando se registran los voltamperogramas de mezclas de estos ditiocarbamatos.

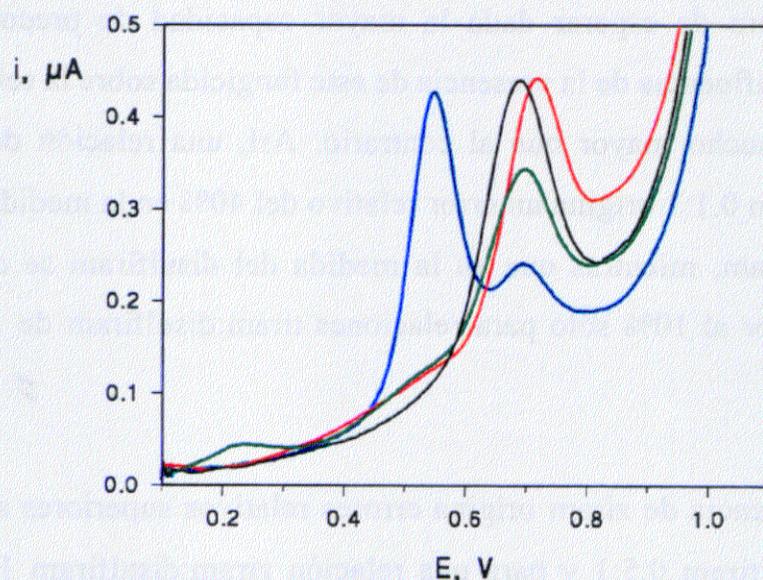


Figura 46

Voltamperogramas, en DPV, de (—) 2.0×10^{-6} mol L⁻¹ tiram, (—) 4.0×10^{-7} mol L⁻¹ disulfiram, (—) 2.0×10^{-6} mol L⁻¹ ziram y (—) 1.0×10^{-5} mol L⁻¹ fenol, empleando un electrodo de pasta de carbono modificado con un 4% de ftalocianina de cobalto. HBO₂/BO₂⁻ 0.1 mol L⁻¹, pH 8.0, 2% de metanol; tiempo de acumulación: 180 s; ΔE= 50 mV, v= 10 mv s⁻¹.

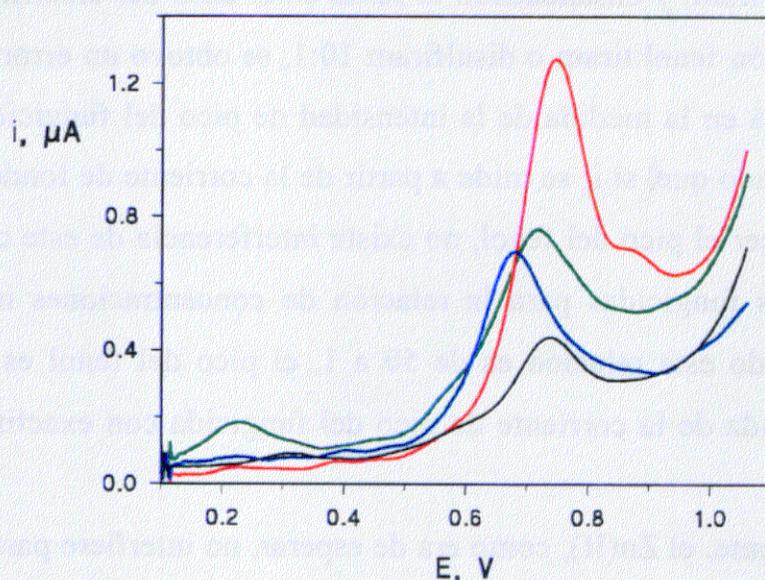


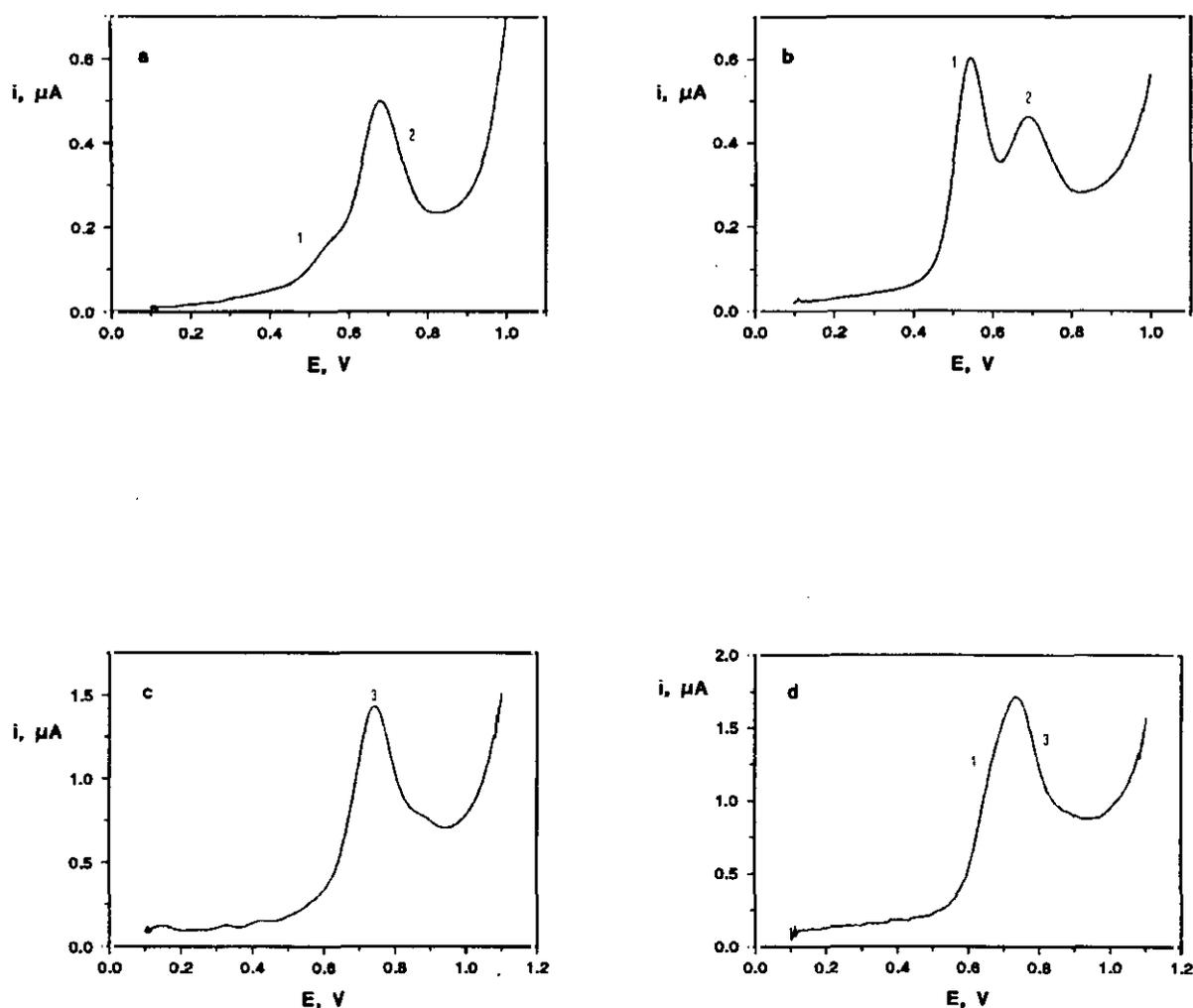
Figura 47

Voltamperogramas, en DPV, de (—) 2.0×10^{-6} mol L⁻¹ disulfiram, (—) 2.0×10^{-6} mol L⁻¹ tiram, (—) 1.0×10^{-5} mol L⁻¹ ziram y (—) 2.0×10^{-5} mol L⁻¹ fenol, empleando un electrodo de pasta de carbono modificado con un 2% de CoPC. H₂PO₄/HPO₄²⁻ 0.1 mol L⁻¹, pH 6.0, 2% de metanol; tiempo de acumulación: 300 s; ΔE= 50 mV, v= 10 mv s⁻¹.

Como era de esperar dada la mayor capacidad de preconcentración del disulfiram, la influencia de la presencia de este fungicida sobre la señal de oxidación del tiram es mucho mayor que al contrario. Así, una relación de concentración disulfiram:tiram 0.1:1 origina un error relativo del 40% en la medida de la corriente de pico del tiram, mientras que en la medida del disulfiram se comete un error relativo superior al 10% sólo para relaciones tiram:disulfiram de 1:1 o superiores (Tabla XXVI).

La presencia de ziram origina errores relativos superiores al 10% para una relación ziram:tiram 0.5:1 y para una relación ziram:disulfiram 1:1 (véase Tabla XXVI). Por otra parte, el fenol muestra un pico de oxidación bien definido que aparece a 0.548 V a pH 8.0 y a 0.682 V a pH 6.0. A modo de ejemplo en la Figura 48 se muestran los voltamperogramas de mezclas binarias de fenol y tiram o disulfiram. El pico de oxidación del fenol afecta sólo a la parte ascendente de los voltamperogramas de tiram o disulfiram, apareciendo como un pico independiente en el caso del tiram, y ensanchando la señal en el caso del disulfiram (Figura 48). Para una relación fenol:tiram o disulfiram 10:1, se obtuvo un error relativo igual o superior al 10% en la medida de la intensidad de pico del fungicida. No obstante, se ha comprobado que, si i_p se mide a partir de la corriente de fondo que se obtiene antes de aparecer el pico del fenol, no existe interferencia de este compuesto sobre la señal de los fungicidas para la relación de concentraciones mencionada. Sin embargo, cuando esta relación es de 50 a 1, el pico del fenol es tan grande que impide la medida de la corriente de pico del fungicida con exactitud.

Finalmente, el Zn(II), como era de esperar, no interfiere para ninguno de los niveles de concentración ensayados.


Figura 48

Voltamperogramas, en DPV, de mezclas de: (a) 2.0×10^{-6} mol L⁻¹ tiram y 2.0×10^{-6} mol L⁻¹ fenol, (b) 2.0×10^{-6} mol L⁻¹ tiram y 2.0×10^{-5} mol L⁻¹ fenol, (c) 2.0×10^{-6} mol L⁻¹ disulfiram y 2.0×10^{-6} mol L⁻¹ fenol, (d) 2.0×10^{-6} mol L⁻¹ disulfiram y 2.0×10^{-5} mol L⁻¹ fenol, sobre un electrodo de pasta de carbono modificado con CoPC. (a) y (b) $\text{HBO}_2/\text{BO}_2^-$ 0.1 mol L⁻¹, 180 segundos de acumulación; (c) y (d) $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0.1 mol L⁻¹, 300 segundos de acumulación; 2% metanol. $\Delta E = 50$ mV, $v = 10$ mV s⁻¹. 1- fenol, 2- tiram, 3- disulfiram.

Tabla XXVI

Efecto de la presencia de otras sustancias sobre la señal voltamperométrica de 2.0×10^{-6} mol L^{-1} de tiram o disulfiram, mediante DPAdSV, sobre un electrodo de pasta de carbono modificado con ftalocianina de cobalto. Relaciones interferente:analito que producen un error relativo superior al 10% en la medida de i_p . Tiram: HBO_2/BO_2^- 0.1 mol L^{-1} , pH 8.0, 2% metanol, 180 segundos de acumulación a circuito abierto. Disulfiram: $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ 0.1 mol L^{-1} , pH 6.0, 2% metanol, 300 segundos de acumulación a circuito abierto. $\Delta E = 50$ mV; $v = 10$ mV s^{-1} .

Interferente	Relación interferente:analito		Error relativo	
	Tiram	Disulfiram	Tiram	Disulfiram
Tiram	---	1:1	---	18%
Disulfiram	0.1:1	---	41%	---
Ziram	0.5:1	1:1	23%	13%
Fenol	10:1	10:1	10%	28%
Zn(II)	50:1	50:1	< 10%	< 10%

III.1.7.- DETERMINACION DE TIRAM EN MUESTRAS DE FRESAS CONTAMINADAS

Como se ha comentado, una de las principales aplicaciones del tiram se basa en su actividad fungicida, empleándose fundamentalmente sobre cultivos de frutas, hortalizas y plantas ornamentales [62]. Concretamente, el empleo de tiram en fresas, manzanas y peras presenta importantes ventajas con respecto a la utilización de otros pesticidas [173]. En la CEE se tolera un contenido de ditiocarbamatos entre 2-7 mg Kg^{-1} (expresado como CS_2) en frutas y verduras [63].

Con objeto de verificar la aplicabilidad del método propuesto utilizando el electrodo de pasta de carbono modificado con CoPC, se ha llevado a cabo la determinación de tiram en muestras de fresas contaminadas con 2 μg de tiram por gramo de fresa (lo que equivale a 1 mg Kg^{-1} de CS_2).

El procedimiento descrito en la parte experimental se aplicó en primer lugar a una muestra de fresas sin contaminar. El voltamperograma diferencial de impulsos obtenido sobre el electrodo modificado para este blanco se muestra en la Figura 49. Como puede observarse, aparece un pico a aproximadamente 0.3 V que puede corresponder a la oxidación de algún compuesto endógeno presente en las fresas, puesto que no se modifica con las adiciones sucesivas de tiram y era reproducible independientemente de la muestra, que no interfiere en la determinación del fungicida. También puede observarse a aproximadamente 0.7 V el pico que se ha asignado a la oxidación de Co(II) a Co(III) en la ftalocianina. La presencia de este pico en el fondo hace necesario, desde un punto de vista analítico, restar esta señal, que no aumenta con el proceso de acumulación, de la respuesta del analito. Para ello, se realizaron adiciones estándar sucesivas de 0.6 mg L^{-1} al blanco de fresas (véase Figura 49) y el valor de la ordenada en el origen obtenido para tres series de medidas, que resultó ser $0.10 \pm 0.03 \mu\text{A}$, se consideró como el valor de corriente que debe restarse del valor de la intensidad de pico medido en los estudios de recuperación del tiram.

Los resultados obtenidos para cinco muestras de fresas contaminadas a un nivel de 2 μg de tiram por gramo de fresa, lo que implica una concentración final de tiram en la disolución analítica de 1.2 mg L^{-1} , aplicando el método de adiciones estándar, se recogen en la Tabla XXVII. La concentración experimental media obtenida fue de $1.12 \pm 0.09 \text{ mg L}^{-1}$ de tiram ($1.9 \pm 0.1 \mu\text{g g}^{-1}$), lo que se traduce en una recuperación media del $94 \pm 7 \%$ para un nivel de significación de 0.05. Estos resultados demuestran la validez del método desarrollado para la determinación de tiram en muestras de este tipo.

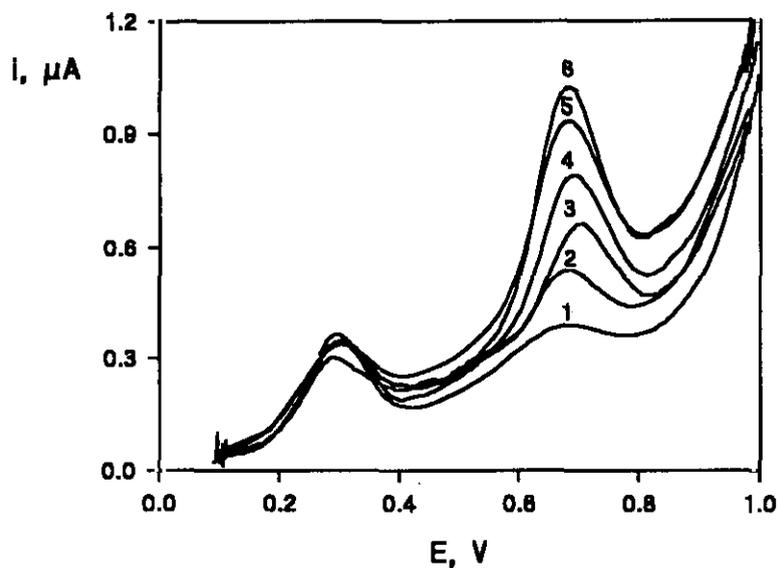


Figura 49

Voltamperogramas, en DPV, sobre un electrodo de pasta de carbono modificado con un 4% de ftalocianina de cobalto, de la disolución analítica de una muestra de fresas sin contaminar. (1) disolución blanco (en ausencia de tiram), (2-6) adiciones sucesivas de 0.6 mg L^{-1} de tiram. $\text{HBO}_2/\text{BO}_2^-$ 0.1 mol L^{-1} , pH 8.0, 2% metanol; $\Delta E = 50 \text{ mV}$; $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$.

Tabla XXVII

Recuperación de tiram en fresas contaminadas, mediante DPAdSV, con un electrodo de pasta de carbono modificado con CoPC. Período de acumulación: 180 s.

Muestra	$C_{\text{teórica}}$ Tiram, mg L^{-1}	$C_{\text{encontrada}}$ Tiram, mg L^{-1}	Recuperación, %
1	1.20	1.11	92.5
2	1.20	1.05	87.5
3	1.20	1.12	93.5
4	1.20	1.24	103.5
5	1.20	1.10	91.5

III.2.- DETERMINACION DE TIRAM MEDIANTE INYECCION EN FLUJO CON DETECCION AMPEROMETRICA SOBRE UN ELECTRODO DE PASTA DE CARBONO MODIFICADO CON FTALOCIANINA DE COBALTO

Se ha investigado la posibilidad de emplear el electrodo de pasta de carbono modificado con CoPC como detector amperométrico en sistemas en flujo. Para ello, se ha desarrollado un método de inyección en flujo basado en el proceso de oxidación del tiram sobre el electrodo modificado. En el apartado II.1.1.1 se describe el sistema FIA utilizado. La célula de flujo empleada ha sido de tipo "thin-layer".

III.2.1.- DETECCION AMPEROMETRICA CONVENCIONAL SOBRE EL ELECTRODO MODIFICADO

Cuando se aplica al electrodo indicador un potencial constante de +1.0 V, se observa una disminución gradual de la corriente de pico tras realizar inyecciones sucesivas de tiram $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, empleando como disolución portadora regulador $\text{HBO}_2/\text{BO}_2^-$ 0.1 mol L^{-1} de pH 8.0 con un 2% de metanol (Figura 50). Por ejemplo, i_p disminuye un 15% tras 17 inyecciones. Además, como puede observarse en la Figura 50, el ruido de la línea base aumenta considerablemente con el tiempo. Estos efectos pueden atribuirse al ensuciamiento de la superficie del electrodo, probablemente como consecuencia de la adsorción del fungicida que, en los experimentos en discontinuo, hace necesaria la renovación de la superficie del electrodo después de cada medida. Este importante problema práctico se ha intentado solventar mediante el empleo de la denominada detección amperométrica de impulsos (PAD).

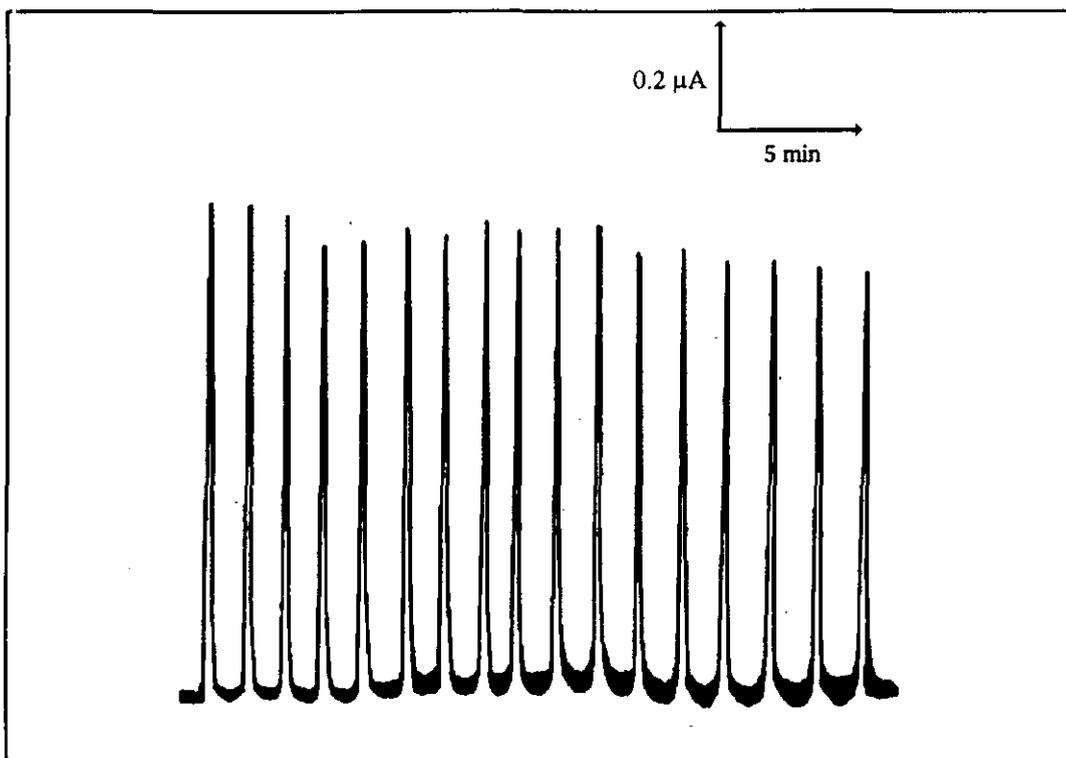


Figura 50

Fiagrama obtenido para inyecciones consecutivas de tiram 1.0×10^{-5} mol L⁻¹ en medio HBO₂/BO₂⁻ 0.1 mol L⁻¹ de pH 8.0 - 2% metanol v/v empleando como electrodo indicador un electrodo de pasta de carbono modificado con un 4% de CoPC. $V_{inj} = 200$ μL; caudal: 1.5 mL min⁻¹; $E_{ap} = +1.0$ V.

III.2.2.- DETECCION AMPEROMETRICA DE IMPULSOS

En la Figura 51 se representa el esquema de potenciales aplicado, que alterna polarización anódica y catódica del electrodo. Esta forma de llevar a cabo la detección ha sido empleada por el grupo de Baldwin con buenos resultados cuando se emplean electrodos de pasta de carbono modificados con CoPC como detectores en cromatografía líquida [26,28].

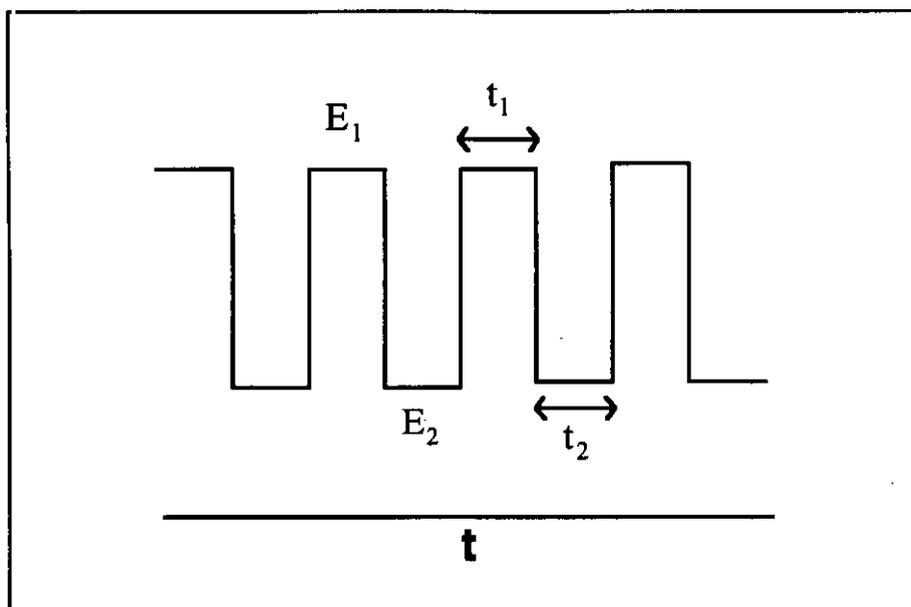


Figura 51

Esquema del programa de potenciales utilizado para la detección amperométrica de impulsos (PAD).

III.2.2.1.- Selección de los valores del potencial aplicados en el programa de impulsos

El potencial anódico, E_1 , se ha escogido para llevar a cabo la detección de la oxidación del tiram, mientras que el potencial catódico, E_2 , se ha elegido para regenerar la superficie del electrodo. Con el fin de seleccionar el valor más apropiado de E_1 se ha registrado el voltamperograma hidrodinámico del tiram, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado II.1.3.5. Así, se inyectaron volúmenes fijos de una disolución de tiram $5.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ en medio $\text{HBO}_2/\text{BO}_2^-$ 0.1 mol L^{-1} de pH 8.0 y 2% v/v en metanol en el caudal de disolución portadora constituida por el mismo electrólito fondo.

En la Figura 52 se representa la variación de la intensidad de pico cuando se varía E_1 entre +0.30 y +1.20 V, manteniendo $E_2 = -0.3$ V, valor de potencial catódico recomendado por el grupo de Baldwin para la reactivación de la superficie del electrodo [26,28]. Como puede observarse, se obtiene una meseta o "plateau" bien definida a valores de E_1 comprendidos entre +0.90 y +1.10 V. La fuerte disminución de i_p a potenciales superiores a +1.10 V puede atribuirse a la pasivación irreversible del mediador redox cuando se aplican potenciales muy positivos [28]. De hecho, en las experiencias realizadas en discontinuo (apartado III.1.2.1), podía observarse un pico de oxidación a aproximadamente +1.2 V vs. SCE asignable a la oxidación del anillo de ftalocianina, cuando se registraba el voltamperograma del fondo, constituido por Britton-Robinson 0.1 mol L⁻¹ de pH 7.0 (Figura 7). Como potencial para llevar a cabo la detección se ha escogido, en consecuencia, un valor de $E_1 = +0.95$ V, situado en la zona de la meseta de intensidades de corriente (Figura 52).

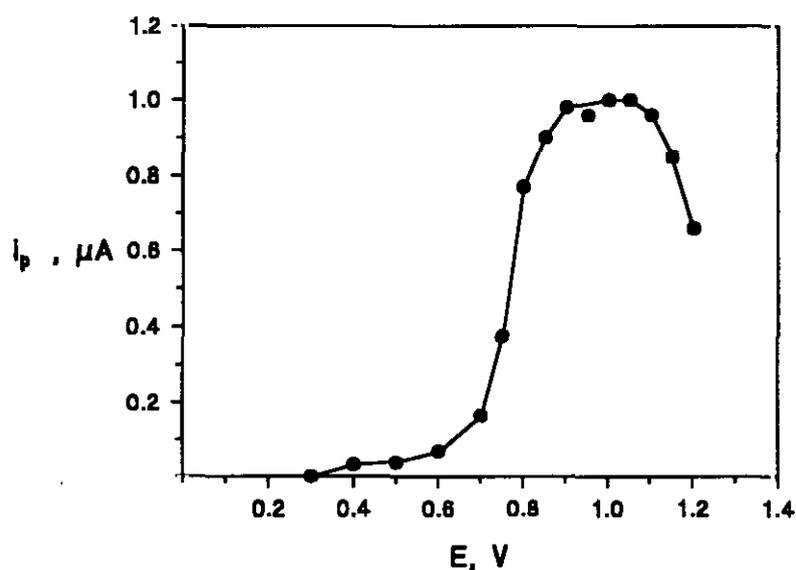


Figura 52

Influencia del potencial anódico, E_1 , sobre la intensidad de pico, i_p , de tiram 5.0×10^{-6} mol L⁻¹ en medio HBO_2/BO_2^- 0.1 mol L⁻¹ de pH 8.0 - 2% metanol v/v, mediante FIA-PAD empleando como electrodo indicador un electrodo de pasta de carbono modificado con un 4% de CoPC. $V_{inv} = 200$ μL ; caudal: 1.5 mL min⁻¹; $E_2 = -0.3$ V; $t_1 = 0.2$ s; $t_2 = 0.2$ s.

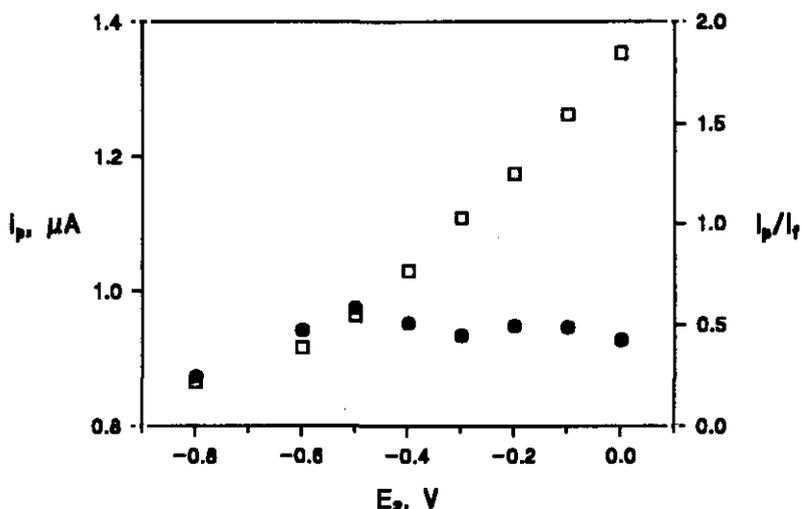


Figura 53

Influencia del potencial catódico, E_2 , sobre la intensidad de pico, i_p (●), y la relación señal/ruido, i_p/i_r (□), de tiram 5.0×10^{-6} mol L⁻¹ en medio HBO₂/BO₂⁻ 0.1 mol L⁻¹ de pH 8.0 -2% metanol v/v, mediante FIA-PAD empleando como electrodo indicador un electrodo de pasta de carbono modificado con un 4% de CoPC. $V_{inj} = 200 \mu\text{L}$; caudal: 1.5 mL min⁻¹; $E_2 = -0.3$ V; $t_1 = 0.2$ s; $t_2 = 0.2$ s.

El valor de E_2 se ha escogido estudiando su influencia sobre la respuesta amperométrica cuando se varía entre 0.0 y -0.80 V. La altura de pico permanece prácticamente constante entre 0.0 y -0.60 V, pero la corriente de fondo aumenta al tomar E_2 valores más negativos (Figura 53). La mayor relación señal/ruido se obtuvo para un valor de $E_2 = 0.0$ V. Sin embargo, no se aprecia regeneración de la superficie del electrodo para este valor de potencial. Así, en la Figura 54 A se observa cómo la altura de pico disminuye tras inyecciones sucesivas de tiram cuando se utiliza $E_2 = 0.0$ V. Al cabo de 20 inyecciones, la disminución en i_p es de un 20%. Como se ha mencionado, el grupo de Baldwin recomienda un valor de -0.30 V (o más negativo) para la regeneración de la superficie del electrodo. Parece ser que esta reactivación está relacionada con el proceso de reducción de Co(II) a Co(I) en la ftalocianina, que tiene lugar entre -0.3 y -0.5 V [26]. Efectivamente, no se observa disminución

significativa en la intensidad de pico al cabo de 20 inyecciones consecutivas de tiram cuando se emplea $E_2 = -0.3$ V (Figura 54 B), por lo que se ha escogido este valor de potencial para la regeneración de la superficie electródica.

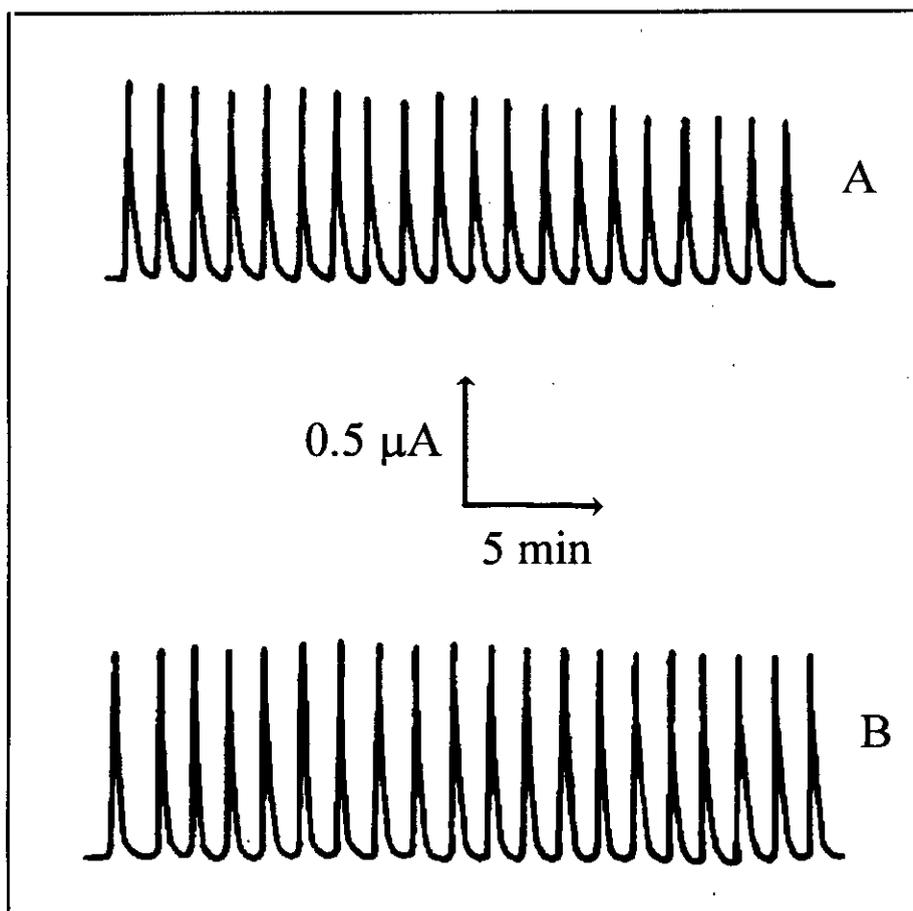


Figura 54

Diagramas obtenidos para 20 inyecciones consecutivas de tiram 5.0×10^{-6} mol L⁻¹ en medio HBO₂/BO₂⁻ 0.1 mol L⁻¹ de pH 8.0 - 2% metanol v/v, mediante FIA-PAD empleando como electrodo indicador un electrodo de pasta de carbono modificado con un 4% de CoPC. $V_{iny} = 200$ μL. Programa de potenciales: (A): $E_1 = +0.95$ V; $E_2 = 0.0$ V; $t_1 = 0.2$ s; $t_2 = 0.2$ s. (B): $E_1 = +0.95$ V; $E_2 = -0.3$ V; $t_1 = 0.2$ s; $t_2 = 0.2$ s.

III.2.2.2.- Selección de los valores de tiempo de aplicación de los potenciales anteriores

Los períodos de tiempo de aplicación de E_1 y E_2 (t_1 y t_2 , respectivamente) se han optimizado teniendo en cuenta su influencia en la respuesta amperométrica.

Cuando t_1 aumenta en el intervalo de 0.2 a 1.0 s, i_p disminuye (Figura 55). No obstante, también disminuye el valor de la corriente de fondo, de tal modo que la relación señal/ruido crece al aumentar t_1 .

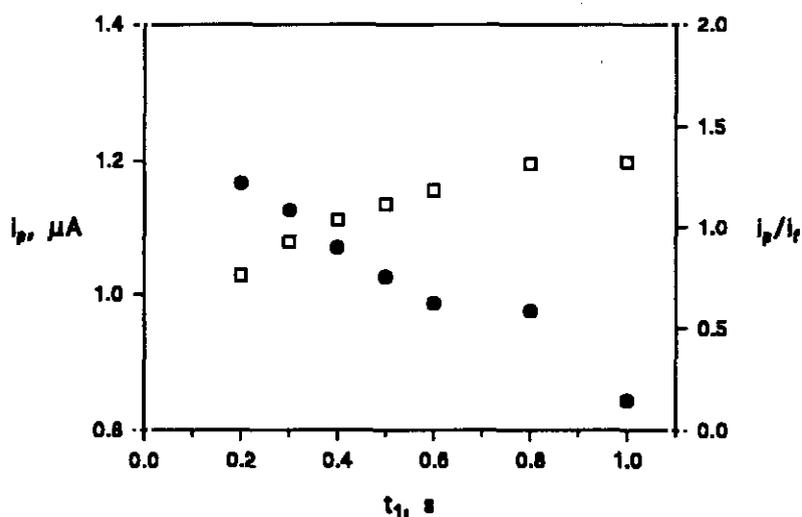


Figura 55

Influencia del tiempo de aplicación del potencial anódico, t_1 , sobre la intensidad de pico, i_p (\bullet), y la relación señal/ruido, i_p/i_r (\square), de tiram $5.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ en medio $\text{HBO}_2/\text{BO}_2^-$ 0.1 mol L^{-1} de pH 8.0 - 2% metanol v/v, mediante FIA-PAD empleando como electrodo indicador un electrodo de pasta de carbono modificado con un 4% de CoPC. $V_{\text{iny}} = 200 \mu\text{L}$; caudal: 1.5 mL min^{-1} ; $E_1 = +0.95 \text{ V}$; $E_2 = -0.3 \text{ V}$; $t_2 = 0.2 \text{ s}$.

La influencia de t_2 se ha estudiado para dos valores de t_1 , 0.2 y 0.4 s. Los resultados se representan en las Figuras 56 y 57. La intensidad de pico aumenta al aumentar t_2 cuando $t_1 = 0.2$ s y permanece prácticamente constante cuando $t_2 = 0.4$ s. Sin embargo, la corriente de fondo aumenta también considerablemente al aumentar t_2 en ambos casos, dando lugar a relaciones señal/ruido más pequeñas cuanto mayor es t_2 . Por otro lado, cuanto mayor es el tiempo transcurrido entre dos medidas de intensidad de corriente ($t_1 + t_2$), peor definida está la señal amperométrica.

Teniendo en cuenta todos estos resultados, se ha escogido un valor de 0.2 s tanto para t_1 como para t_2 para estudios posteriores.

Empleando los parámetros del programa de potenciales que se han seleccionado, se obtuvo una desviación estándar relativa del 2.1% en la medida de i_p para 20 inyecciones sucesivas de tiram 5.0×10^{-6} mol L⁻¹ (Figura 54 B), lo que confirma la utilidad del esquema de detección amperométrica de impulsos desarrollado para la regeneración de la superficie del electrodo modificado con CoPC.

III.2.2.3.- Optimización de las variables hidrodinámicas

Se ha estudiado la influencia del caudal de la disolución portadora sobre los parámetros que definen las señales o fiagramas, esto es, la altura de pico, i_p , el tiempo de residencia, T , y la anchura de pico, Δt . Los datos obtenidos se resumen en la Tabla XXVIII y están representados en las Figuras 58, 59 y 60.

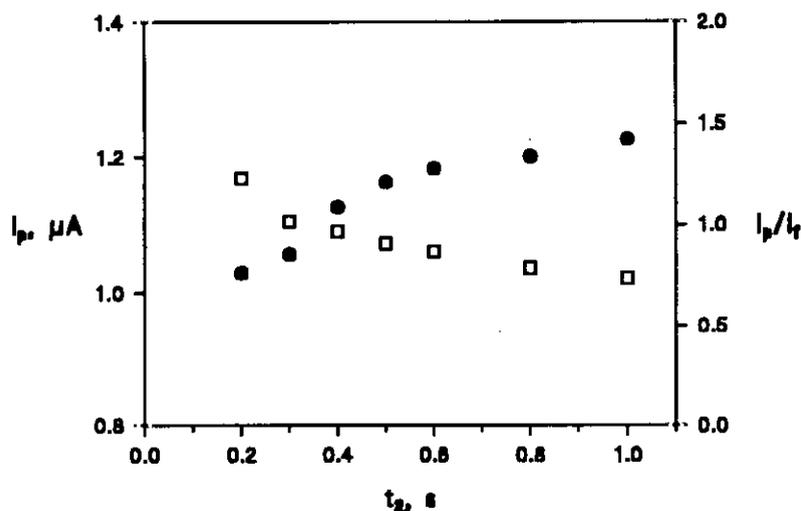


Figura 56

Influencia del tiempo de aplicación de E_2 , t_2 , sobre la intensidad de pico, i_p (●), y la relación señal/ruido, i_p/i_r (□), de tiram 5.0×10^{-6} mol L^{-1} en medio HBO_2/BO_2^- 0.1 mol L^{-1} de pH 8.0 - 2% metanol v/v, mediante FIA-PAD empleando como electrodo indicador un electrodo de pasta de carbono modificado con un 4% de CoPC. $V_{iny} = 200$ μL ; caudal: 1.5 mL min^{-1} ; $E_1 = +0.95$ V; $E_2 = -0.3$ V; $t_1 = 0.2$ s.

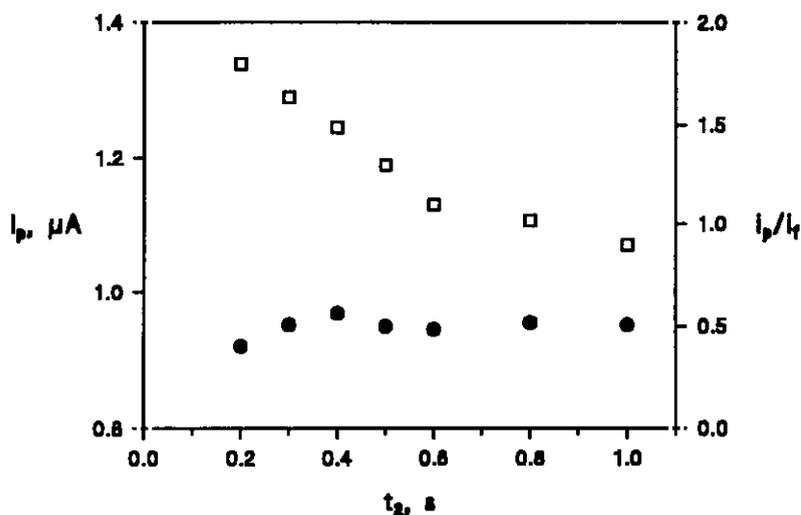


Figura 57

Influencia del tiempo de aplicación de E_2 , t_2 , sobre la intensidad de pico, i_p (●), y la relación señal/ruido, i_p/i_r (□), de tiram 5.0×10^{-6} mol L^{-1} en medio HBO_2/BO_2^- 0.1 mol L^{-1} de pH 8.0 - 2% metanol v/v, mediante FIA-PAD empleando como electrodo indicador un electrodo de pasta de carbono modificado con un 4% de CoPC. $V_{iny} = 200$ μL ; caudal: 1.5 mL min^{-1} ; $E_1 = +0.95$ V; $E_2 = -0.3$ V; $t_1 = 0.4$ s.

Tabla XXVIII

Influencia del caudal de la disolución portadora sobre la intensidad, i_p , el tiempo de residencia, T , y la anchura, Δt , de la señal obtenida mediante inyección en flujo con detección amperométrica de impulsos empleando un electrodo de pasta de carbono modificado con un 4% de CoPC. Tiram 5.0×10^{-6} mol L⁻¹ en medio HBO₂/BO₂⁻ 0.1 mol L⁻¹, pH 8.0, 2% metanol (v/v). Volumen de inyección: 200 μ L. $E_1 = +0.95$ V, $E_2 = -0.3$ V, $t_1 = 0.2$ s, $t_2 = 0.2$ s.

Caudal, mL min ⁻¹	i_p , μ A	T, s	Δt , s
0.35	0.64	52	47
0.64	0.76	27	32
0.96	0.87	19	19
1.32	0.94	13	13
1.68	0.94	11	11
2.00	0.94	7.8	9.0
2.34	0.92	8.1	8.4
2.65	0.93	7.8	7.8

Puede observarse cómo al aumentar el caudal de la disolución portadora desde 0.35 hasta 1.32 mL min⁻¹, aumenta la intensidad de pico, disminuyendo el tiempo de residencia y la anchura de pico. Para caudales superiores a 1.32 mL min⁻¹, la altura de pico permanece constante y la disminución en el tiempo de residencia y la anchura de pico es mucho menos marcada.

Con el fin de alcanzar la máxima sensibilidad y al mismo tiempo reducir en lo posible la duración del análisis, se ha escogido para estudios posteriores un caudal de 1.70 mL min⁻¹.

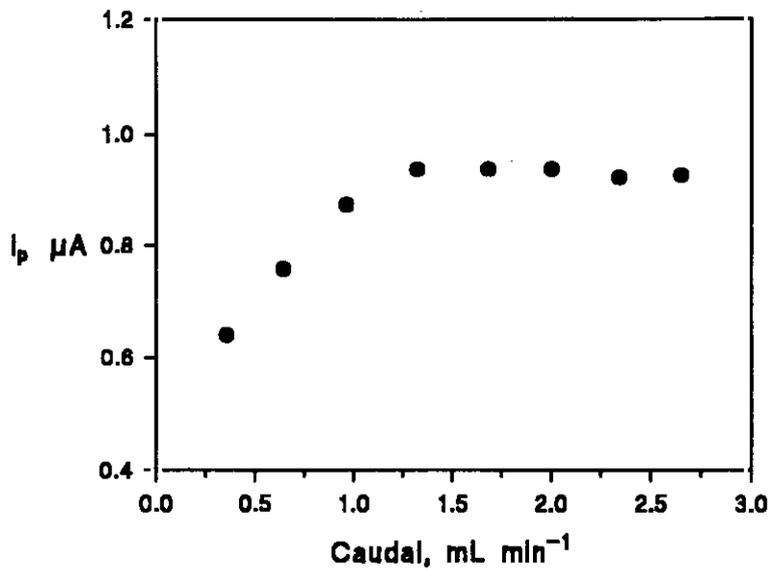


Figura 58

Influencia del caudal de la disolución portadora sobre la intensidad de pico, i_p , de tiram $5.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ en medio $\text{HBO}_2/\text{BO}_2^-$ 0.1 mol L^{-1} de pH 8.0 - 2% metanol v/v, mediante FIA-PAD empleando como electrodo indicador un electrodo de pasta de carbono modificado con un 4% de CoPC. $V_{\text{iny}} = 200 \mu\text{L}$; $E_1 = +0.95 \text{ V}$; $E_2 = -0.3 \text{ V}$; $t_1 = 0.2 \text{ s}$, $t_2 = 0.2 \text{ s}$.

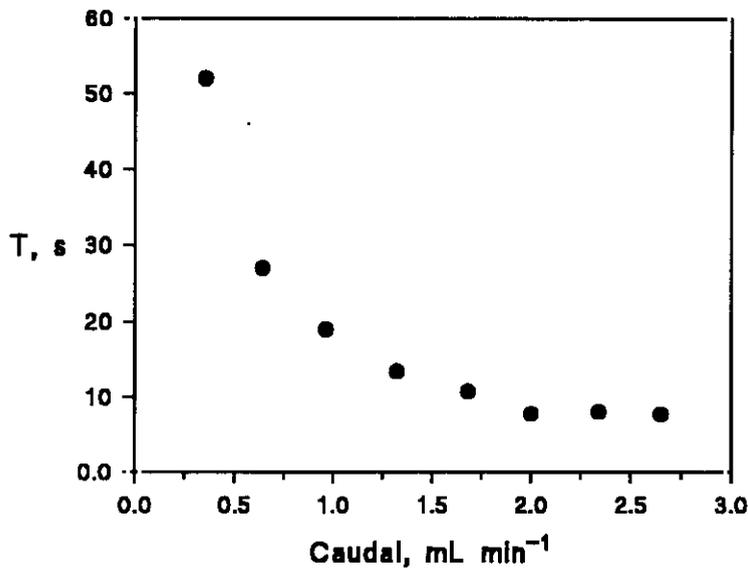
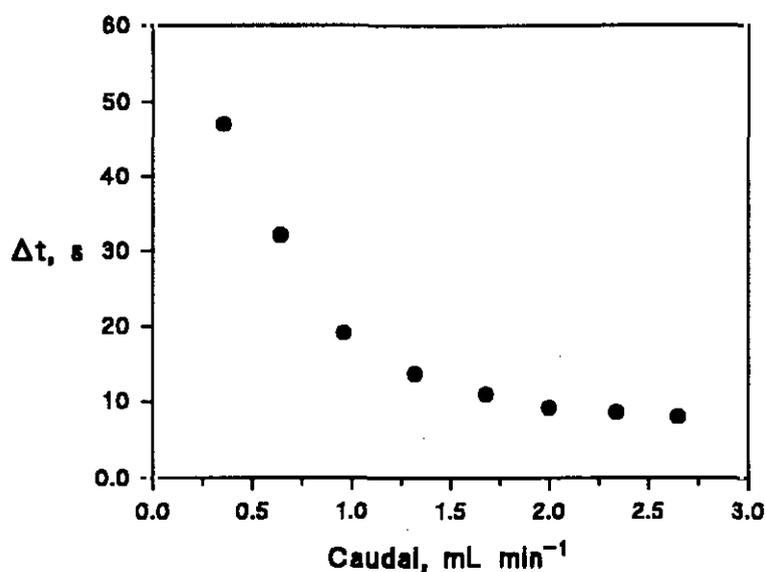


Figura 59

Influencia del caudal de la disolución portadora sobre el tiempo de residencia, T , de tiram $5.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ en medio $\text{HBO}_2/\text{BO}_2^-$ 0.1 mol L^{-1} de pH 8.0 - 2% metanol v/v, mediante FIA-PAD empleando como electrodo indicador un electrodo de pasta de carbono modificado con un 4% de CoPC. $V_{\text{iny}} = 200 \mu\text{L}$; $E_1 = +0.95 \text{ V}$; $E_2 = -0.3 \text{ V}$; $t_1 = 0.2 \text{ s}$, $t_2 = 0.2 \text{ s}$.

**Figura 60**

Influencia del caudal de la disolución portadora sobre la anchura de pico, Δt , de tiram 5.0×10^{-6} mol L⁻¹ en medio HBO₂/BO₂⁻ 0.1 mol L⁻¹ de pH 8.0 - 2% metanol v/v, mediante FIA-PAD empleando como electrodo indicador un electrodo de pasta de carbono modificado con un 4% de CoPC. $V_{iny} = 200 \mu\text{L}$; $E_1 = +0.95 \text{ V}$; $E_2 = -0.3 \text{ V}$; $t_1 = 0.2 \text{ s}$, $t_2 = 0.2 \text{ s}$.

Utilizando el caudal mencionado anteriormente y manteniendo las demás condiciones experimentales, se ha estudiado la influencia del volumen de inyección sobre los parámetros característicos del fiagrama (Figura 61). Como puede apreciarse, al aumentar el volumen de inyección se produce un aumento de la intensidad de pico, así como en la anchura de los mismos. Además, lógicamente, el tiempo de residencia aumenta también al aumentar el volumen de inyección. Como compromiso entre una buena sensibilidad y una elevada capacidad de muestreo, se ha escogido un volumen de inyección de 200 μL para estudios subsiguientes. En estas condiciones experimentales, se pueden analizar aproximadamente 15 muestras por hora realizando las inyecciones por triplicado.

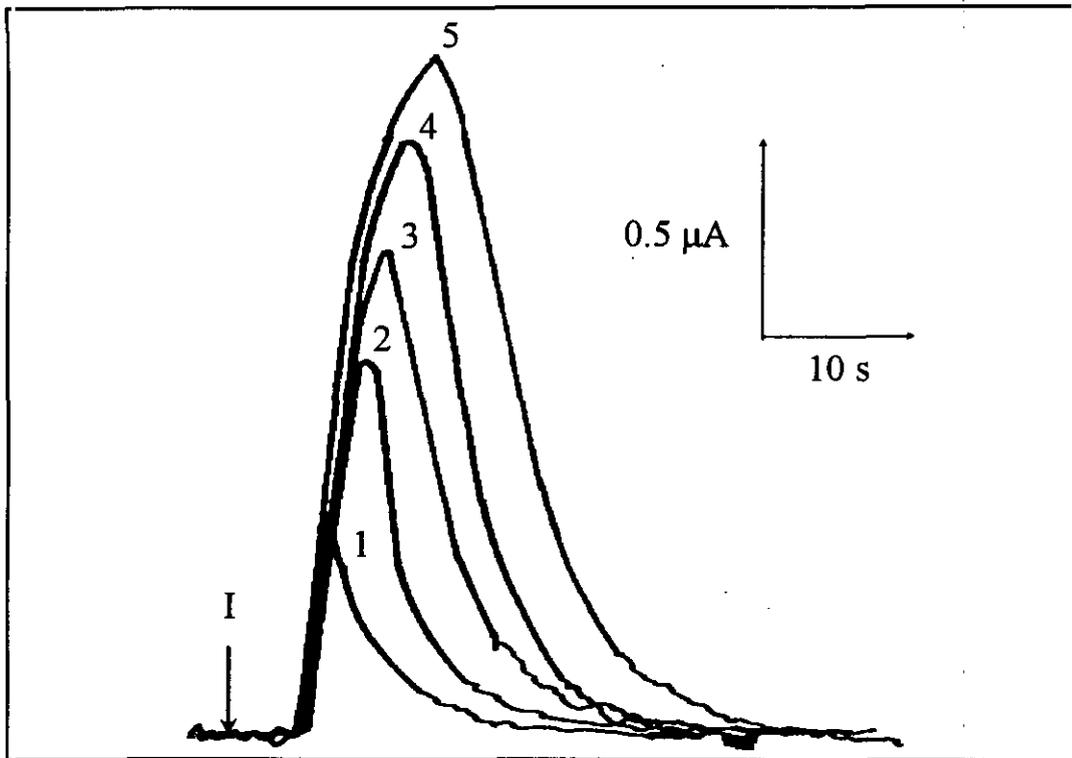


Figura 61

Influencia del volumen de inyección sobre las señales obtenidas para tiram $5.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ en medio HBO_2/BO_2 0.1 mol L^{-1} de pH 8.0 - 2% metanol v/v, mediante FIA-PAD empleando como electrodo indicador un electrodo de pasta de carbono modificado con un 4% de CoPC. (1) $50 \mu\text{L}$; (2) $100 \mu\text{L}$; (3) $200 \mu\text{L}$; (4) $300 \mu\text{L}$; (5) $400 \mu\text{L}$. Caudal: 1.70 mL min^{-1} ; $E_1 = +0.95 \text{ V}$; $E_2 = -0.3 \text{ V}$; $t_1 = 0.2 \text{ s}$, $t_2 = 0.2 \text{ s}$.

III.2.2.4.- Curvas de calibrado

Se ha obtenido una relación lineal ($r=0.9990$) entre la intensidad de pico y la concentración de tiram en el intervalo $1.0 \times 10^{-6} - 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, con valores de la pendiente y de la ordenada en el origen de $(1.9 \pm 0.7) \times 10^5 \mu\text{A L mol}^{-1}$ y $0.01 \pm 0.04 \mu\text{A}$, respectivamente. En la Figura 62 se muestran los diagramas obtenidos en este intervalo de concentraciones, y en la Figura 63 se representa la correspondiente curva de calibrado.

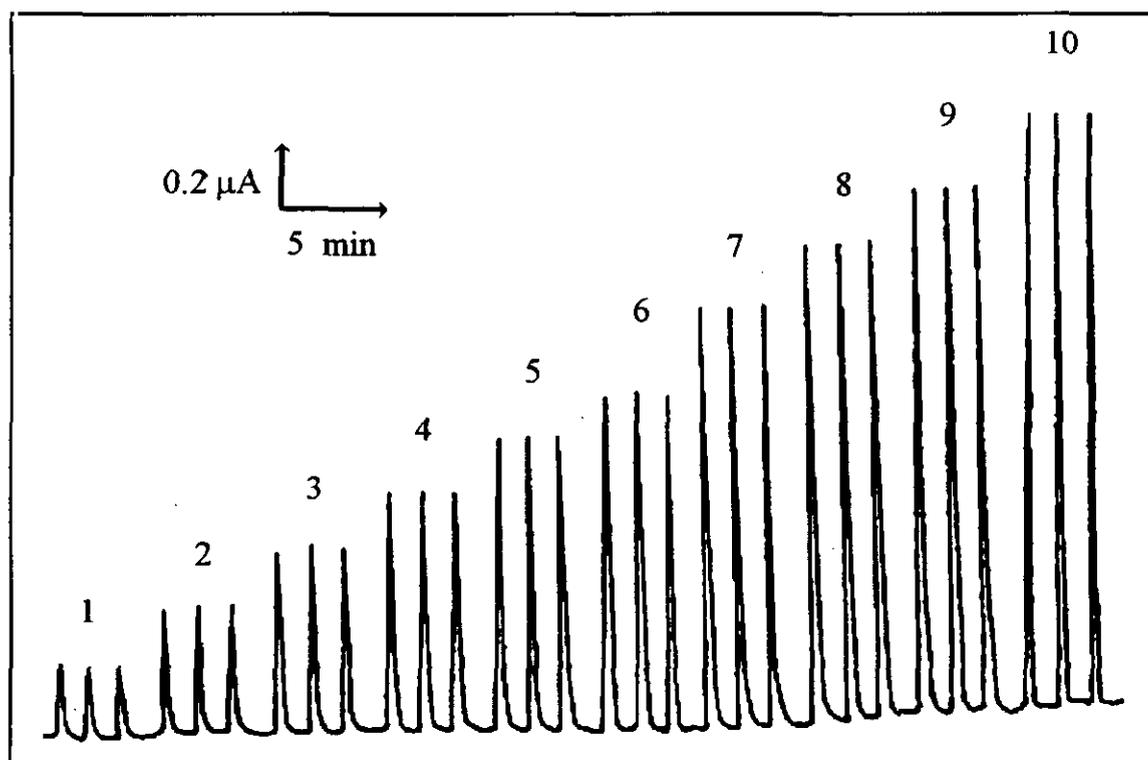


Figura 62

Fiagrama obtenido por inyección de disoluciones (1) 1.0; (2) 2.0; (3) 3.0; (4) 4.0; (5) 5.0; (6) 6.0; (7) 7.0; (8) 8.0; (9) 9.0; (10) 10.0 $\times 10^{-6}$ mol L⁻¹ de tiram en medio HBO₂/BO₂⁻ 0.1 mol L⁻¹ de pH 8.0 - 2% metanol v/v, mediante FIA-PAD empleando como electrodo indicador un electrodo de pasta de carbono modificado con un 4% de CoPC. V_{iny} = 200 μL. Caudal: 1.70 mL min⁻¹; E₁ = +0.95 V; E₂ = -0.3 V; t₁ = 0.2 s, t₂ = 0.2 s.

Para concentraciones de tiram superiores a 1.0×10^{-5} mol L⁻¹ se observó una desviación de la linealidad. El valor de la pendiente obtenido con este calibrado es sustancialmente mayor que el correspondiente al calibrado en las experiencias en discontinuo empleando voltamperometría diferencial de impulsos sin aplicar acumulación. Sin embargo, dicha pendiente es muy similar a la obtenida para el mismo intervalo de linealidad cuando se aplicó un período de acumulación de 300 segundos (véase Tabla XXIV).

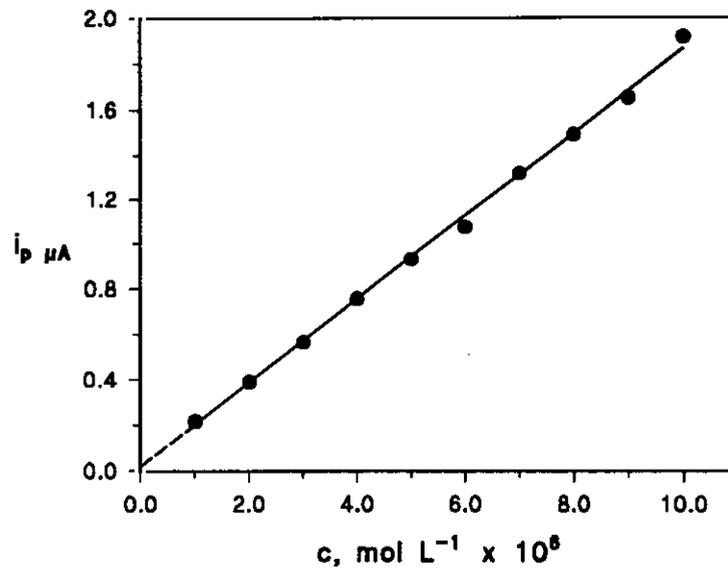


Figura 63

Influencia de la concentración de tiram sobre la intensidad de pico, i_p , obtenida mediante FIA-PAD, empleando como electrodo indicador un electrodo de pasta de carbono modificado con un 4% de CoPC. $V_{iny} = 200 \mu L$. Caudal: $1.70 mL min^{-1}$; $E_1 = +0.95 V$; $E_2 = -0.3 V$; $t_1 = 0.2 s$, $t_2 = 0.2 s$.

Cuando se aumentó la sensibilidad del registrador con el fin de realizar medidas en el intervalo de concentraciones $1.0 \times 10^{-7} - 1.0 \times 10^{-6} mol L^{-1}$ de tiram, se observó que la corriente de fondo aumentaba considerablemente con el tiempo. Este hecho produce una considerable falta de exactitud en las medidas e impide la determinación de este fungicida a dichos niveles de concentración bajos. A modo de ejemplo, en la Figura 64 se representa el diagrama obtenido para 3 inyecciones de tiram $5.0 \times 10^{-7} mol L^{-1}$ cuando la sensibilidad del registrador es la necesaria para medir con exactitud las señales correspondientes a inyecciones de tiram $1.0 \times 10^{-7} mol L^{-1}$.

Como se ha comentado (apartado I.2.2.1), algunos autores han reportado problemas graves al utilizar los electrodos de pasta de carbono como detectores en

sistemas en flujo, tales como hinchamiento del material electródico [49,50] o pérdida progresiva del mediador redox en la superficie del electrodo, e incluso de la propia pasta, por arrastre con la disolución portadora [21,51]. Según nuestra propia experiencia, el crecimiento de la corriente residual con el tiempo se debe a fenómenos de hinchamiento por hidratación de la pasta de carbono.

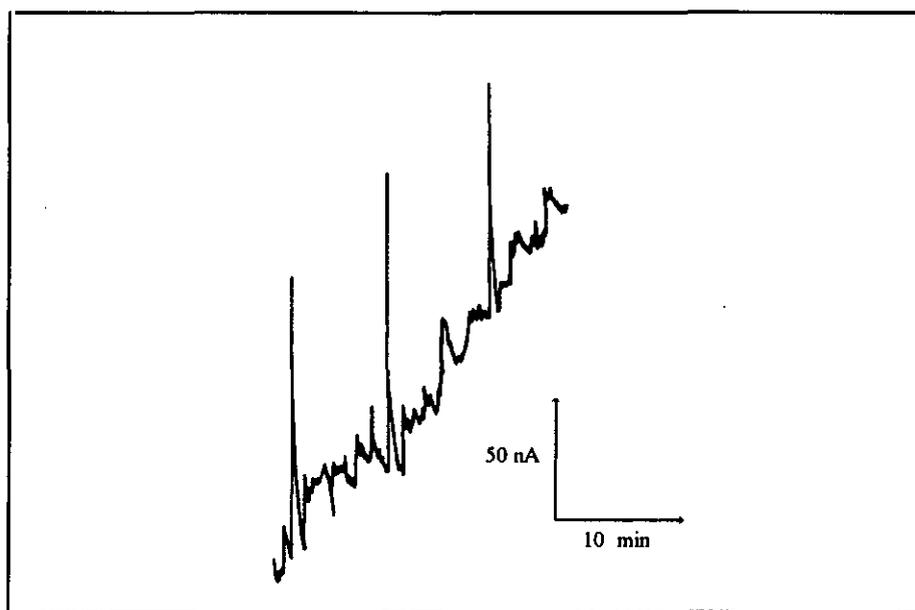


Figura 64

Diagrama obtenido para inyecciones de tiram $5.0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ en medio $\text{HBO}_2/\text{BO}_2^-$ 0.1 mol L^{-1} de pH 8.0 - 2% metanol v/v, mediante FIA-PAD empleando como electrodo indicador un electrodo de pasta de carbono modificado con un 4% de CoPC. $V_{\text{iny}} = 200 \mu\text{L}$. Caudal: 1.70 mL min^{-1} ; $E_1 = +0.95 \text{ V}$; $E_2 = -0.3 \text{ V}$; $t_1 = 0.2 \text{ s}$, $t_2 = 0.2 \text{ s}$.

Cuando la corriente residual es tan grande que es necesario interrumpir el experimento y se retira el electrodo indicador de la célula de flujo, puede observarse a simple vista el aumento en volumen de la pasta de carbono, puesto que sobresale considerablemente respecto al nivel superficial del soporte del electrodo. En algunas ocasiones, el hinchamiento es tan grande que puede interrumpir el paso de disolución portadora por la célula de flujo.

Todos estos problemas dificultan la aplicación práctica del electrodo de pasta de carbono modificado desarrollado como detector amperométrico en sistemas en flujo. Además, su utilización en medios de alto contenido en disolventes orgánicos, como los eluyentes utilizados en cromatografía líquida, sería mucho más complicada. El hinchamiento en medios orgánicos que pueden disolver al aglutinante de la pasta de carbono es mucho más acusado y el electrodo se disuelve en poco tiempo [15]. Como se ha comentado en el apartado de Introducción, una interesante estrategia para tratar de solucionar estos problemas y mejorar la estabilidad del electrodo es el empleo de diferentes matrices electrónicas, tales como cemento de carbono conductor [51], grafito-resina epoxi [52-54], carbono-Kel-F [49], o como se verá en capítulos posteriores grafito-teflón.

III.3.- EVALUACION CUANTITATIVA DE TIRAM Y DISULFIRAM MEDIANTE TECNICAS QUIMIOMETRICAS MULTIVARIANTES

Como se ha venido comentando en el capítulo anterior, el similar comportamiento voltamperométrico que exhiben tanto el tiram como el disulfiram sobre el electrodo de pasta de carbono modificado con ftalocianina de cobalto, impide la determinación simultánea de ambos fungicidas, puesto que sus señales voltamperométricas interfieren entre si.

Una estrategia para resolver este problema, sin necesidad de emplear técnicas de separación, es mediante la aplicación de técnicas quimiométricas multivariantes basadas en el tratamiento matemático de las señales obtenidas. En nuestro caso, el diseño experimental que se propone es sumamente simple puesto que son solamente dos los compuestos químicos con los que se va a trabajar. Como técnicas a aplicar se han escogido, yendo de menor a mayor grado de complejidad, la Regresión por Componentes Principales (PCR), la Regresión mediante Mínimos Cuadrados Parciales (PLSR) y el empleo de una Red Neuronal con propagación hacia atrás.

III.3.1.- REGRESION MEDIANTE COMPONENTES PRINCIPALES (PCR) Y MINIMOS CUADRADOS PARCIALES (PLSR)

Cuando se quieren obtener relaciones entre grupos de variables, el método de regresión usualmente utilizado es la Regresión Lineal Múltiple (MLR). Para aplicar MLR es necesario que las variables independientes (agrupadas en la matriz **X**) no estén correlacionadas linealmente entre si y que, tanto éstas como los errores de las predicciones, se distribuyan normalmente. Sin embargo, en muchos casos es necesario trabajar con variables altamente correlacionadas entre sí (colineales) y que por tanto, no deberían aparecer en el modelo que se propone, ya que pueden contribuir significativamente a la varianza de las variables independientes.

Para soslayar el problema de la colinealidad, es posible construir nuevas variables independientes linealmente, denominadas variables latentes, reduciendo al mismo tiempo la dimensionalidad del espacio de las variables independientes. Esta metodología se conoce como Análisis por Componentes Principales (PCA) [174].

PCA construye variables ortogonales mediante combinaciones lineales de las variables originales, maximizando además la relación (covarianza) de estas nuevas variables con las variables originales. De esta forma, puede mantenerse la mayor parte de la información original (varianza) disminuyendo el número de variables iniciales. Una vez extraídas las variables latentes, denominadas usualmente en PCA componentes principales (PCs), se relacionan con las variables independientes mediante MLR. El principal problema que presenta esta metodología se deriva de que los PCs han sido calculados sin tener en cuenta su relación con las variables dependientes y, por tanto, es posible encontrar PCs que, explicando una gran parte de la varianza de las variables independientes, no contribuyan de la misma forma a la explicación de las dependientes.

El modelo PLSR (Regresión mediante Mínimos Cuadrados Parciales) calcula las variables latentes teniendo en cuenta su relación con las variables dependientes. De esta forma, se mantienen las ventajas del PCA y se obtienen soluciones más estables que con MLR al no introducir valores propios de la matriz $X^T X$ cercanos o iguales a cero [175].

Los métodos PLS permiten predecir la existencia, o no, de cada uno de los componentes de una mezcla y, su o sus concentraciones dentro de un intervalo de error obtenido simultáneamente en el proceso de cálculo. Estos métodos han sido aplicados en Química Analítica a la resolución de problemas tales como estudios de interferencias y análisis multivariante con el propósito de disponer de un medio que facilite la toma de decisiones acerca de cuáles de las variables experimentales son auténticamente significativas en el sistema químico que se estudia [177-183].

III.3.1.1.- Descripción de los modelos matemáticos empleados

Los diferentes modelos comentados en el apartado anterior pueden ser descritos gráficamente como sigue:

PCR:

$$\begin{array}{l}
 \begin{array}{c}
 \begin{array}{c}
 \boxed{X} \\
 N \quad M
 \end{array}
 =
 \begin{array}{c}
 \boxed{T} \\
 N \quad D
 \end{array}
 \begin{array}{c}
 \boxed{P^T} \\
 D \quad M
 \end{array}
 +
 \begin{array}{c}
 \boxed{E} \\
 N \quad M
 \end{array}
 \quad (\text{PCA})
 \end{array} \\
 \\
 \begin{array}{c}
 \begin{array}{c}
 \boxed{Y} \\
 N \quad R
 \end{array}
 =
 \begin{array}{c}
 \boxed{T} \\
 N \quad D
 \end{array}
 \begin{array}{c}
 \boxed{B} \\
 D \quad R
 \end{array}
 +
 \begin{array}{c}
 \boxed{F} \\
 N \quad R
 \end{array}
 \quad (\text{MLR})
 \end{array}
 \end{array}$$

PLSR:

$$\begin{array}{l}
 \begin{array}{c}
 \begin{array}{c}
 \boxed{X} \\
 N \quad M
 \end{array}
 =
 \begin{array}{c}
 \boxed{T} \\
 N \quad D
 \end{array}
 \begin{array}{c}
 \boxed{P^T} \\
 D \quad M
 \end{array}
 +
 \begin{array}{c}
 \boxed{E} \\
 N \quad M
 \end{array}
 \end{array} \\
 \\
 \begin{array}{c}
 \begin{array}{c}
 \boxed{Y} \\
 N \quad R
 \end{array}
 =
 \begin{array}{c}
 \boxed{U} \\
 N \quad D
 \end{array}
 \begin{array}{c}
 \boxed{Q^T} \\
 D \quad R
 \end{array}
 +
 \begin{array}{c}
 \boxed{F} \\
 N \quad R
 \end{array}
 \end{array}
 \end{array}$$

X es una matriz de dimensiones $N \times M$, siendo N el número de objetos (muestras) y M el número de variables (valores de potencial en los voltamperogramas), con elementos x_{ij} con $i=1, \dots, N$ y $j=1, \dots, M$.

Y es una matriz de dimensiones $N \times R$, siendo R el número de variables de respuesta (concentraciones), con elementos r_{ik} con $k=1, \dots, R$.

T es una matriz de dimensiones $N \times D$, siendo la matriz de variables latentes o "scores" de la matriz X , es decir, la matriz de las proyecciones de los objetos sobre los componentes. Los "scores" indican qué objetos son responsables de la mayor parte de la varianza de una serie de datos.

P^T es una matriz de dimensiones $D \times M$, siendo D el número de variables latentes utilizadas, con elementos p_{dj}^T con $d=1, \dots, D$. Contiene los vectores P^T de pesos de las combinaciones lineales o "loadings" (coeficientes que relacionan las variables de medida con las variables latentes) de la matriz X .

E es la matriz de residuos de X , que contiene el error achacable a los resultados de las lecturas instrumentales; consecuentemente, la magnitud de los elementos de la matriz E da idea de la cantidad de ruido experimental [184] de las medidas.

B es una matriz de dimensiones $D \times R$ y contiene los pesos que relacionan T e Y .

F es la matriz de residuos de Y , que contiene los errores en la medida de las concentraciones de los analitos; consecuentemente la magnitud de los elementos de la matriz F da idea de la cantidad de "ruido químico".

U es una matriz de dimensiones $N \times D$; es la matriz de variables latentes de la matriz Y , cuyos elementos serán u_{ij} , y representa la asociación existente entre las variables de medida y las variables latentes de respuesta.

Q^T es una matriz de dimensiones $D \times R$, y es la matriz de "loadings" (coeficientes que relacionan las variables de respuesta con las variables latentes) de la matriz Y . Los "loadings" son los coeficientes de regresión entre cada variable y

cada factor, e indican directamente cómo contribuye cada variable original a cada componente.

Además, es necesario definir otra matriz que no aparece explícitamente en el modelo:

W es una matriz de dimensiones $M \times D$, que se conoce como la matriz de pesos ("loading weights") de la matriz X , con elementos w_{jd} ; la matriz W maximiza la covarianza entre las variables iniciales y las variables latentes de respuesta.

Matemáticamente, las matrices W , U , T , Q^T , P^T se definen como conjuntos de vectores propios, columna o fila, obtenidos mediante las siguientes operaciones [185]:

W matriz de vectores propios, columna, de la matriz producto de matrices: $X^T Y Y^T X$

U matriz de vectores propios, columna, de la matriz producto de matrices: $Y Y^T X X^T$

T matriz de vectores propios, columna, de la matriz producto de matrices: $X X^T Y Y^T$

Q^T matriz de vectores propios, fila, de la matriz producto de matrices: $Y^T X X^T Y$

P^T matriz de vectores propios, fila, de la matriz producto de matrices: $W^T X^T X W$.

Para obtener las variables latentes, se exige que maximicen la varianza con las variables iniciales; además, en PLS, se exige a las variables latentes que maximicen la correlación entre ellas y las variables de respuesta. Matemáticamente, la condición que deben cumplir las variables latentes es:

PCR: $\max [\text{var}(Xp_d^{\wedge})]$

PLS: $\max [\text{corr}^2(Y, Xw_d^{\wedge}) \text{var}(Xw_d^{\wedge})]$

Es de esperar, por tanto, que la varianza de las variables independientes explicada por las variables latentes, sea menor en el caso de PLSR que en el de

PCA, aunque en la mayoría de las ocasiones, experimentalmente, la reducción es muy pequeña.

III.3.2.- REDES NEURONALES

Las redes neuronales constituyen un método muy sensible que puede utilizarse de forma rutinaria para este tipo de predicciones aunque solamente después de una cuidadosa planificación preliminar y de su puesta a punto a partir de experimentos de ensayo-error [186].

La teoría de las redes neuronales [187-191] extiende el concepto de la *máquina de aprendizaje lineal (LLM)* [192], la primera técnica de identificación de muestras patrón basada en inteligencia artificial, introducida en Química Analítica por Jurs, Kowalski e Isenhour a principios de los 70 [193], y que posteriormente se aplicó al análisis cuantitativo [194].

Los primeros estudios sobre el desarrollo de sistemas que pudiesen aprender de la experiencia, como se realiza en los seres vivos, tuvieron lugar hacia 1950. McCulloch y Pitts [195] formularon una teoría para intentar explicar el funcionamiento cerebral como un órgano computacional. No obstante, las diversas limitaciones encontradas y su escasa aplicabilidad a la resolución de problemas reales, restaron interés a la investigación sobre redes neuronales hasta la aparición, en 1982, del artículo de Hopfield [196]. Este autor introdujo un nuevo concepto, la "no linealidad" entre la entrada total que recibe una neurona y la salida producida y transmitida hacia otras neuronas. La introducción de la "no linealidad" y la posibilidad de "retroalimentación" en el acoplamiento de salidas con entradas confiere nueva flexibilidad a la arquitectura de la red neuronal tradicional. Desde la aparición del artículo de Hopfield, el interés por las redes neuronales ha aumentado

considerablemente, no sólo entre los científicos interesados por la inteligencia artificial, sino también en la mayor parte de las restantes áreas de la Ciencia [186].

En el campo de la Química, la teoría de las redes neuronales encuentra importantes aplicaciones, especialmente por lo que se refiere a la interpretación de conjuntos de datos complejos como pueden ser los espectros, secuencias de aminoácidos o series de datos procedentes de procesos de control complejos [186,197].

En términos generales, la red neuronal puede representarse como un dispositivo que recibe una serie de señales de entrada y emite una determinada información de salida. Para cada problema concreto, es necesario diseñar una red neuronal y "entrenarla". El entrenamiento, que suele ser un proceso bastante lento, es compensado por la gran rapidez en el procesamiento de datos que ofrece la red entrenada.

El término "redes neuronales" tiene su origen en la similitud de funcionamiento existente entre el artilugio matemático y las células cerebrales (Figura 65). La "neurona biológica" recibe una serie de señales de entrada procedentes de otras neuronas a través de las *dendritas*. Si la suma de estas señales en un momento dado excede de un valor umbral determinado, el *cuerpo* de la célula genera una señal de salida que se transmite a otras neuronas a través del *axón*. La unión que permite el paso de una neurona a la siguiente se denomina *sinapsis*. La magnitud de la influencia de esta señal en la siguiente neurona depende de la eficiencia de la sinapsis intermediaria. Esta eficiencia se llama *fuerza de sinapsis*.

De forma análoga, la "neurona artificial" (Figura 65) recibe señales procedentes de otras neuronas (o del exterior) y emite una señal de salida que llega a la siguiente neurona de la red a través de una conexión que equivale a una sinapsis

biológica. La fuerza de sinapsis se representa a través de un peso asociado a cada conexión.

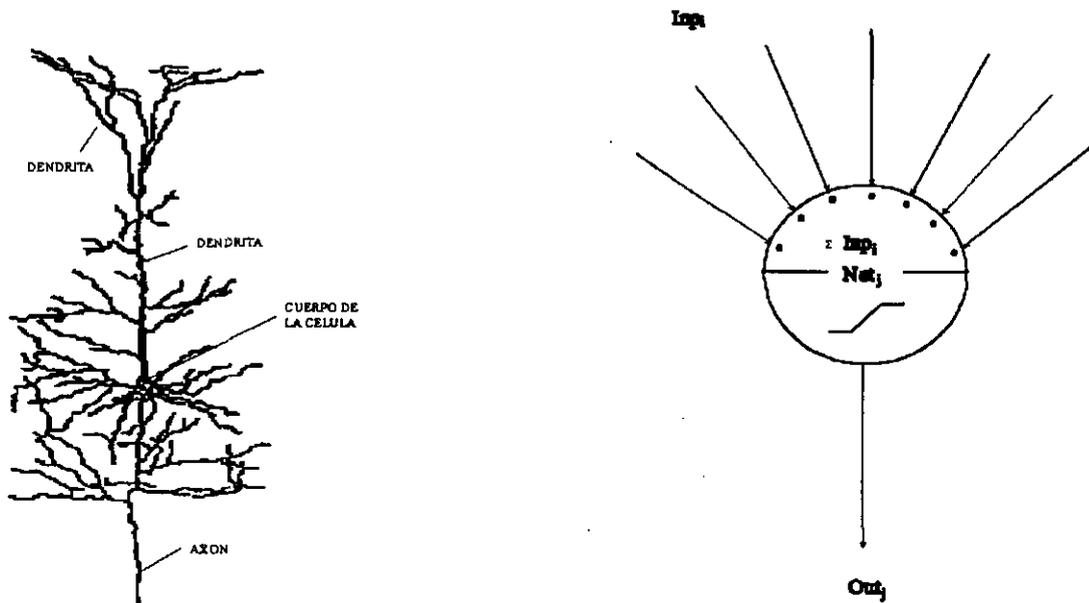


Figura 65

Comparación de la estructura de una neurona biológica (a la izquierda) con una neurona artificial (a la derecha).

El peso es simplemente un número real. Si es positivo, anima a la neurona que recibe la señal a transmitir su propia señal de salida. Si es negativo, tiende a disuadir a la neurona de la transmisión de la señal. Cuanto mayor es la magnitud del peso, mayor es el efecto. Los valores de los pesos asociados a las neuronas en una red, determinan las propiedades de la red y el entrenamiento se lleva a cabo modificando estos pesos de forma apropiada. Dentro de cada neurona (llamada j), tiene lugar un proceso que consta de dos etapas. En primer lugar, todas las entradas (Inp_i) se combinan teniendo en cuenta sus pesos para producir una entrada neta (Net_j). Matemáticamente:

$$Net_j = \sum_i Inp_i w_{ij} \quad (1)$$

donde w_{ij} representa el peso asociado a la conexión a través de la cual la señal Inp_i entra en la neurona j . En el siguiente paso, Net_j se transforma de forma no lineal para generar la salida Out_j . La función que permite el cálculo de Out_j a partir de Net_j se denomina "función de transferencia".

Las funciones de transferencia más utilizadas son la función sigmoideal :

$$f(u) = 1 / [1 + \exp(-u)] \quad (2)$$

o la llamada función de umbral lógico, mucho más rápida:

$$f(u) = \text{máx} [0 , \text{mín}(u,1)] \quad (3)$$

Para hacer ambas funciones más adaptables a diferentes escalas y posiciones de la entrada neta Net (por ejemplo, de un argumento arbitrario u), se suelen emplear dos coeficientes, α y θ .

$$u = \alpha v + \theta \quad (4)$$

Así, las funciones de transferencia se escriben de forma más general:

$$f(v) = 1 / [1 + \exp(-\alpha v + \theta)] \quad (5)$$

$$f(v) = \text{máx} \{ 0 , \text{mín} [(\alpha v + \theta) , 1] \} \quad (6)$$

Escribiendo el argumento arbitrario u en términos de la entrada neta de la neurona j (Net_j) y su salida (Out_j):

$$\text{Out}_j (\text{Net}_j) = 1 / \{ 1 + \exp [-(\alpha_j \text{Net}_j + \theta_j)] \} \quad (7)$$

$$\text{Out}_j (\text{Net}_j) = \text{máx} \{ 0 , \text{mín} [(\alpha_j \text{Net}_j + \theta_j) , 1] \} \quad (8)$$

La ecuación (1) puede a su vez escribirse:

$$\text{Net}_j = \sum_i (x_i w_{ij}) + \theta_j \quad (9)$$

El valor de α_j está implícito en la ecuación anterior como un factor de escala de los pesos w_{ij} . Además de los pesos w_{ij} , se necesita un factor de sesgo, el parámetro θ_j , para determinar el funcionamiento correcto de la neurona j . Cada neurona j necesita el parámetro θ_j para ajustar su entrada global Net_j de forma que pueda aplicarse la función de transferencia con el máximo beneficio para el correcto funcionamiento de la red.

La arquitectura de una red neuronal viene determinada por la forma en que las salidas de unas neuronas se conectan con otras neuronas. En la arquitectura estándar, las neuronas de una red se dividen en grupos llamados "capas", siendo posibles arquitecturas mono- y multicapa (poliestratificadas). En la figura 66 se muestra una red neuronal poliestratificada. Las capas de neuronas existentes entre la *capa de entrada* y la *capa de salida* se denominan *capas ocultas*. Todas las n neuronas de una capa tienen el mismo número, por ejemplo m , de entradas y, por tanto, el mismo número de pesos w_{ij} , que serán modificados durante el entrenamiento de la red. Así, todas las neuronas de esta capa reciben simultáneamente la señal de entrada x (x_1, x_2, \dots, x_m) procedente de una serie de neuronas (m) de la capa precedente. Las n salidas Out_j ($j=1, \dots, n$) de la capa son generadas simultáneamente a través de la ecuación (7) o (8). En una estructura monocapa, estas salidas constituyen la respuesta final de la red.

En una arquitectura multicapa, las n salidas llegan a la siguiente capa, formada por p neuronas. Esta nueva capa tiene, evidentemente, $n \times p$ pesos y produce p salidas que se propagarán a posteriores capas. La topología de la red, número de capas y de neuronas en cada capa viene condicionada por la naturaleza del problema y solo se puede averiguar mediante un proceso de prueba y error, que decidiría la arquitectura óptima de la red y que es válido para cualquier tipo de red neuronal.

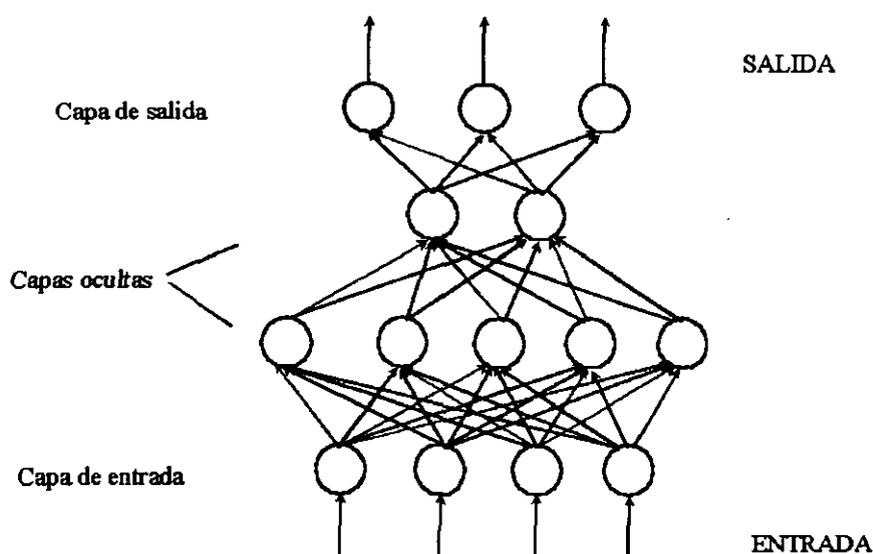


Figura 66

Representación de una red neuronal de propagación hacia atrás poliestratificada

El entrenamiento de la red neuronal consiste en encontrar la correcta combinación de todos los factores de peso w_{ij} y de los parámetros α_j y θ_j que produzca las respuestas apropiadas para entradas conocidas (valores de medida obtenidos con patrones). Para ello, existen diversos procedimientos [197], de los cuales, el más utilizado recibe el nombre de *propagación hacia atrás*, que se basa en la llamada "regla delta" para la corrección de los pesos de cada capa n , $\Delta w_{ij}^n = (w_{ij}^{\text{nuevo}} - w_{ij}^{\text{antiguo}})^n$, durante el aprendizaje de la red:

$$\Delta w_{ij}^n = \eta \delta_j^n \text{Out}_i^{n-1} \quad (10)$$

Esta regla establece que el cambio de peso Δw_{ij}^n en la capa n debe ser proporcional al error δ_j^n que produce en la salida de la neurona j y a la señal Out_i^{n-1} procedente de la neurona i de la capa anterior. El parámetro η se conoce como *tasa de aprendizaje*.

En el algoritmo de propagación hacia atrás, el cálculo de δ_j^n se realiza mediante el llamado método de gradiente descendiente. Este método requiere que las correcciones realizadas vayan siempre encaminadas a la minimización del error E^n en la capa n [186].

En general, para conseguir una convergencia más rápida con menos oscilaciones, y para evitar quedar atrapado en mínimos locales, la ecuación general para la corrección de los pesos (ecuación 10) se complementa con un término adicional:

$$\Delta w_{ij}^n = \eta \delta_j^n \text{Out}_i^{n-1} + \mu \Delta w_{ij}^{n(\text{previo})} \quad (11)$$

donde μ se denomina *término de momento* y $\Delta w_{ij}^{n(\text{previo})}$ es el cambio del peso w_{ij}^n del ciclo de aprendizaje previo.

III.3.3.- DESARROLLO DEL METODO

El objetivo de este capítulo es realizar el análisis de mezclas de tiram y disulfiram en la región intermedia del calibrado dinámico de medidas mediante los métodos quimiométricos referidos anteriormente, con un doble fin: averiguar cuál o cuáles de los dos fungicidas están presentes en una disolución desconocida y, lógicamente, proceder a su determinación cuantitativa asociando un margen de error a esta predicción.

El medio de trabajo escogido fue regulador $\text{HBO}_2/\text{BO}_2^-$ 0.1 mol L^{-1} de pH 8.0 con un 2% de metanol (v/v). El estudio se realizó en el intervalo de concentraciones 1.0×10^{-6} - $9.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ para cada fungicida, a partir de los datos procedentes de los voltamperogramas obtenidos mediante la técnica diferencial de impulsos tras la aplicación de un período de acumulación de 180 segundos y utilizando una velocidad de barrido de potencial de 10 mV s^{-1} y una amplitud del impulso de 50 mV.

III.3.3.1.- DISEÑO EXPERIMENTAL

Cuando se investiga la dependencia de un determinado proceso de diversos factores experimentales, es necesario obtener un compromiso entre el tamaño del espacio paramétrico, definido por el número de variables independientes, y el número de experiencias que es factible y lógico realizar para la investigación de aquél. Esta necesidad se concreta en un diseño experimental que, en Química Analítica, se ha reflejado en la admisión de los métodos quimiométricos multivariantes como herramienta habitual de trabajo para el análisis simultáneo de varios componentes en situaciones de baja resolución y de relación señal-ruido poco favorable.

En este caso, al tratarse solamente de dos compuestos químicos, el diseño propuesto es muy simple. Se escogieron 22 combinaciones de tiram y disulfiram, 12 para la calibración (validación interna) y 10 de predicción (validación externa), con objeto de cubrir el máximo espacio muestral. En la figura 67 se muestra la disposición final de las muestras y en la Tabla XXIX las combinaciones de las concentraciones.

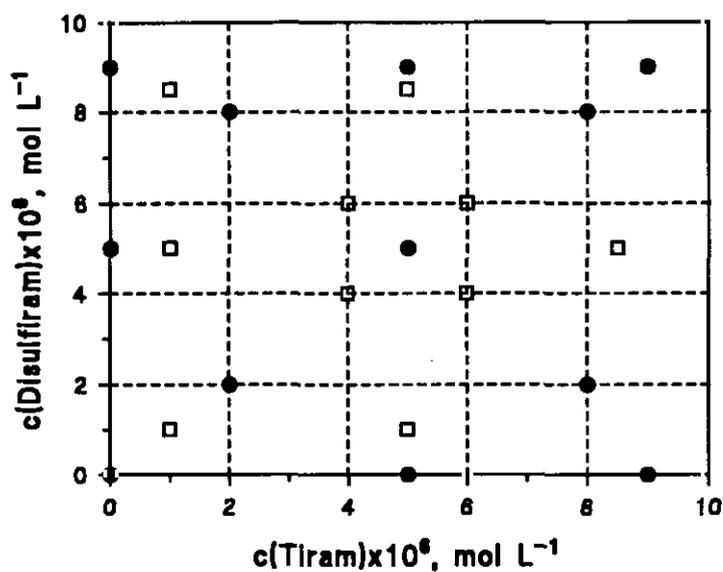


Figura 67

Representación gráfica de las combinaciones de tiram y disulfiram escogidas: (●) validación interna, (□) validación externa.

Tabla XXIX

Combinaciones de tiram y disulfiram utilizadas

Validación interna		Validación externa	
$c_{\text{Tiram}}, \times 10^6, \text{mol L}^{-1}$	$c_{\text{Disulfiram}}, \times 10^6, \text{mol L}^{-1}$	$c_{\text{Tiram}}, \times 10^6, \text{mol L}^{-1}$	$c_{\text{Disulfiram}}, \times 10^6, \text{mol L}^{-1}$
0.0	0.0	1.0	1.0
0.0	5.0	1.0	5.0
0.0	9.0	1.0	8.5
2.0	2.0	4.0	4.0
2.0	8.0	4.0	6.0
5.0	0.0	5.0	1.0
5.0	5.0	5.0	8.5
5.0	9.0	6.0	4.0
8.0	2.0	6.0	6.0
8.0	8.0	8.5	5.0
9.0	0.0		
9.0	9.0		

III.3.3.2.- Regresión mediante PCR y PLSR

Teóricamente los resultados obtenidos al aplicar PLSR deben ser mejores, o al menos similares, a los que se obtienen mediante PCR. Se ha procedido a la aplicación de ambos métodos y se han comparado mediante la función RMSEP (Root Mean of Squares Prediction). Dicha función se define como:

$$RMSEP = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2}$$

$$RRMSEP = \frac{RMSEP}{C} \cdot 100$$

Generalmente esta función tiende a un mínimo o a un gráfico tipo ladera de Cattel, escogiéndose la dimensionalidad latente que minimice la función o aquella donde aparezca el 'codo' de la curva. En la Tabla XXX aparecen los resultados de la magnitud RMSEP obtenida comparando los dos métodos de regresión mencionados.

A partir de los datos de la Tabla XXX puede deducirse que para el tiram, tanto en PCR como en PLSR, el número óptimo de variables latentes es de 7, mientras que para el disulfiram es de 6. Además, para los dos pesticidas, el resultado de PLSR es mejor que el de PCR, alcanzándose la constancia del error con un menor número de dimensiones latentes, confirmándose lo que se esperaba.

Tabla XXX

*Resultados obtenidos aplicando PCR y PLSR como RMSEP, \pm mol L⁻¹*10⁻⁶*

Dimensión	Tiram		Disulfiram	
	PLSR	PCR	PLSR	PCR
1	1.43	0.95	1.91	2.00
2	0.94	0.95	1.03	1.03
3	0.87	0.95	1.23	1.03
4	0.83	1.11	1.17	1.24
5	0.70	0.89	1.23	1.22
6	0.73	0.82	1.17	1.07
7	0.67	0.67	1.29	1.28
8	0.65	0.70	1.26	1.28
9	0.64	0.68	1.25	1.26
10	0.64	0.68	1.25	1.28

Es posible la existencia de datos experimentales que no sean representativos de la población real (en este caso las concentraciones de los dos pesticidas). Estos datos anómalos o extremos ("outliers") suelen influir en la construcción de los modelos, dando lugar a relaciones falsas entre las variables independientes y las dependientes.

La detección de los datos anómalos se realizó en el número óptimo de variables latentes para ambos compuestos. En las siguientes tablas aparecen los

resultados de las predicciones y los residuales, en tanto por ciento, correspondientes a los modelos construidos con 7 variables latentes para el tiram y 6 para el disulfiram.

Tabla XXXI

Tiram. Predicciones con 7 variables latentes para el conjunto empleado en la validación externa del tiram

Muestra	$c \cdot 10^6, \text{ mol L}^{-1}$	$\hat{c}_{\text{pred}} \cdot 10^6, \text{ mol L}^{-1}$	ER(%)
1	1.0	0.7	30
2	5.0	3.4	32
3	1.0	1.1	10
4	1.0	1.3	30
5	8.5	7.9	7
6	5.0	5.4	8
7	4.0	3.9	3
8	6.0	6.2	3
9	4.0	5.0	25
10	6.0	6.3	5

Tabla XXXII

Predicciones con 6 variables latentes para el conjunto empleado en la validación externa del disulfiram

Muestra	$c \cdot 10^6, \text{ mol L}^{-1}$	$\hat{c}_{\text{pred}} \cdot 10^6 \text{ mol L}^{-1}$	ER(%)
1	1.0	0.8	20
2	1.0	3.8	280
3	5.0	5.1	2
4	8.5	7.0	18
5	5.0	4.3	14
6	8.5	8.5	0
7	4.0	4.5	13
8	4.0	4.8	20
9	6.0	4.8	20
10	6.0	5.2	13

La muestra 2 del conjunto de validación externa presenta errores muy altos, especialmente por lo que se refiere a la concentración de disulfiram, en comparación con los demás, por lo que se ha decidido eliminarla y referir los datos sin considerarla en una predicción posterior. En la Tabla XXXIII aparecen los resultados de la validación externa sin tener en cuenta la contribución al error de la muestra 2.

Tabla XXXIII

*Resultados refinados de PCR y PLSR como RMSEP, $\pm \text{mol L}^{-1} * 10^6$*

Dimensión	Tiram		Disulfiram	
	PLSR	PCR	PLSR	PCR
1	1.44	1.00	1.77	1.85
2	1.10	0.99	0.94	0.94
3	0.92	0.99	1.25	0.95
4	0.62	1.17	1.11	1.23
5	0.59	0.94	0.99	1.26
6	0.64	0.86	0.80	1.06
7	0.45	0.50	0.94	1.02
8	0.43	0.51	0.88	1.01
9	0.42	0.45	0.87	0.95
10	0.42	0.45	0.87	0.88

El número óptimo de variables latentes se conserva en 7 y 6 para el tiram y el disulfiram, respectivamente. No obstante, el resultado de RMSEP mediante PLSR para el tiram ha descendido de ± 0.67 hasta ± 0.45 y para el disulfiram de ± 1.17 hasta ± 0.80 , confirmándose la elevada influencia que tenía la muestra 2 en el error de los resultados.

En la siguiente Tabla se resumen los valores de las funciones de error RMSEP y RRMSEP para los dos fungicidas empleando el número óptimo de variables latentes para cada uno de ellos.

Fungicida	RMSEP $\times 10^6 \text{ mol L}^{-1}$	RRMSEP %
Tiram	± 0.45	11.1
Disulfiram	± 0.80	15.1

III.3.3.3.- Aplicación de redes neuronales mediante propagación hacia atrás

Las redes neuronales han sido aplicadas en análisis cuantitativo fundamentalmente cuando al aplicar algoritmos lineales (PCR, PLSR, ...) la varianza residual obtenida no se considera aceptable, sospechándose la existencia de relaciones no lineales. Puesto que en el problema concreto que nos ocupa, la aplicación de PCR y PLSR a las mezclas de los fungicidas ha dado lugar a valores de RRMSEP superiores al 10%, tanto para el tiram como para el disulfiram, parece aconsejable el empleo de redes neuronales con objeto de obtener predicciones más fiables.

Se ha aplicado una red sencilla, consistente en una capa de entrada, una oculta y otra de salida, empleándose el algoritmo de propagación hacia atrás para su entrenamiento. Se han escogido los datos de las combinaciones de los pesticidas empleadas en la calibración con PCR y PLSR y, como entradas de la red, las variables latentes obtenidas. Es de destacar que, a nuestro entender y considerando

la literatura que se ha consultado, es la primera vez que se emplean componentes PLS como entradas. En principio, el uso de estos componentes debe mejorar los resultados obtenidos con la utilización de componentes PCA, debido a que cuando se obtienen aquellos se tiene en cuenta su relación con las variables de respuesta mientras que en PCR no.

La topología óptima de los modelos para cada compuesto se ha obtenido mediante un proceso de prueba y error, y se puede expresar como $a:b:c$, siendo a el número de entradas, b las neuronas en la capa oculta y c las neuronas en la capa de salida, que en este caso siempre son iguales a 1. Se ha empleado una red para cada compuesto.

Se ha variado el número de unidades ocultas, el tipo de función de transferencia y el número de entradas. En este último caso se han empleado 10 componentes principales, PCA y PLS, y el número óptimo de componentes para cada compuesto comentado en el apartado III.3.3.2.

III.3.3.3.1.- Especificaciones de las redes utilizadas

En la tabla XXXIV aparecen los diferentes parámetros que se han empleado en las redes neuronales.

El término de momento fue fijado en 0 debido a que se obligó a que la tasa de aprendizaje descendiera a medida que avanzaba el entrenamiento. Fijar la tasa de aprendizaje no es deseable ya que puede causar saltos continuos sobre el mínimo de la superficie del error, no manteniéndose la dirección de descenso de éste; para evitarlo se pueden adoptar dos estrategias:

- Técnica del término de momento: añadir una fracción del incremento de los pesos de la iteración anterior.

- Disminución de la tasa de aprendizaje a medida que avanza éste, con esto se evita lo descrito anteriormente. Esta técnica ha sido la adoptada.

Tabla XXXIV

Características de las redes neuronales utilizadas

PARAMETROS	DESCRIPCION
Neuronas de entrada	6, 7 ó 10 Componentes PCA o PLSR
Neuronas ocultas	Variable entre 1 y 7
Neuronas de salida	1 en todos los casos
Tasa de aprendizaje (η)	Variable en función del desarrollo del aprendizaje: linealmente descendiente entre 0.9 y 0.001
Término de momento (μ)	0 en todos los casos
Función de transferencia capa de entrada	Lineal
Función de transferencia capa oculta	Sigmoidal
Función de transferencia capa de salida	Lineal o Sigmoidal
Número de iteraciones	500

III.3.3.3.2.- Resultados

En las Tablas XXXV a XXXVIII se recogen los resultados obtenidos al aplicar dicha metodología.

Tabla XXXV

Resultados obtenidos para el tiram cuando se utilizan como entradas los componentes PCA, expresados como $\pm RMSEP \cdot 10^6 \text{ mol L}^{-1}$

Unidades ocultas	M = 10		M = 7	
	Lineal	Sigmoidal	Lineal	Sigmoidal
1	0.63	0.62	0.54	0.68
2	0.54	0.58	0.48	0.66
3	0.47	0.544	0.53	0.61
4	0.48	0.546	0.52	0.59
5	0.49	0.524	0.55	0.59
6	0.54	0.532	0.58	0.59
7	0.59	0.513	0.61	0.59

Tabla XXXVI

Resultados obtenidos para el disulfiram cuando se utilizan como entradas los componentes PCA, expresados como $\pm RMSEP \cdot 10^6 \text{ mol L}^{-1}$

Unidades ocultas	M = 10		M = 6	
	Lineal	Sigmoidal	Lineal	Sigmoidal
1	0.89	0.83	2.02	1.16
2	0.95	0.76	1.59	1.07
3	0.88	0.75	1.33	1.04
4	0.86	0.74	1.34	1.10
5	0.81	0.77	1.32	1.00
6	0.96	0.77	1.48	1.01
7	0.94	0.79	1.48	0.99

Tabla XXXVII

Resultados obtenidos para el tiram cuando se utilizan como entradas los componentes PLS, expresados como $\pm RMSEP \cdot 10^6 \text{ mol L}^{-1}$

Unidades ocultas	M = 10		M = 7	
	Lineal	Sigmoidal	Lineal	Sigmoidal
1	0.41	0.71	0.54	0.74
2	0.35	0.68	0.45	0.72
3	0.34	0.67	0.42	0.72
4	0.34	0.66	0.42	0.68
5	0.35	0.66	0.51	0.70
6	0.47	0.65	0.65	0.68
7	0.66	0.65	0.71	0.68

Tabla XXXVIII

Resultados obtenidos para el disulfiram cuando se utilizan como entradas los componentes PLS, expresados como $\pm RMSEP \cdot 10^6 \text{ mol L}^{-1}$

Unidades ocultas	M = 10		M = 6	
	Lineal	Sigmoidal	Lineal	Sigmoidal
1	0.81	0.78	1.01	1.24
2	0.80	0.74	1.11	1.22
3	0.79	0.76	1.14	1.12
4	0.77	0.74	1.16	1.11
5	0.77	0.74	1.18	1.07
6	0.78	0.78	1.15	1.05
7	0.77	0.77	1.24	1.03

En general, la función RMSEP de los modelos con componentes PLSR como entradas es menor que utilizando componentes PCA. Además, RMSEP es menor si se emplean 10 componentes principales en vez del número óptimo de componentes PCA o PLSR. Estos resultados muestran que, en nuestro caso concreto, cuanto mayor es el número de componentes utilizados en el cálculo, mejor son los resultados obtenidos con la red neuronal, en contraposición a cuando se emplean modelos lineales, PLS o PCR, donde la importancia de tales componentes decrece a medida que se calculan éstos.

En el modelo no lineal utilizado, la red neuronal, los componentes de menor entidad parece que juegan un papel importante, sobre todo en el tiram donde se ha conseguido una disminución de RMSEP de 0.45 (PLSR) a 0.35 (red neuronal). Merece destacarse los resultados para el disulfiram cuando se trabaja con 6 componentes principales, PCA o PLSR, porque no siguen la tendencia comentada. RMSEP para los modelos constituidos con los componentes PCA y función sigmoide de salida son ligeramente mejores que los obtenidos empleando PLSR.

El mejor resultado para el tiram es el obtenido con una topología 10:2:1, 10 entradas, 2 neuronas ocultas, y función lineal de salida. Para el disulfiram los resultados son muy parecidos en todos los casos. También se ha escogido para este fungicida un modelo de topología 10:2:1, pero con función sigmoide de salida.

Fungicida	RMSEP $\times 10^6 \text{ mol L}^{-1}$	RRMSEP %
Tiram	± 0.35	7.4
Disulfiram	± 0.74	13.4

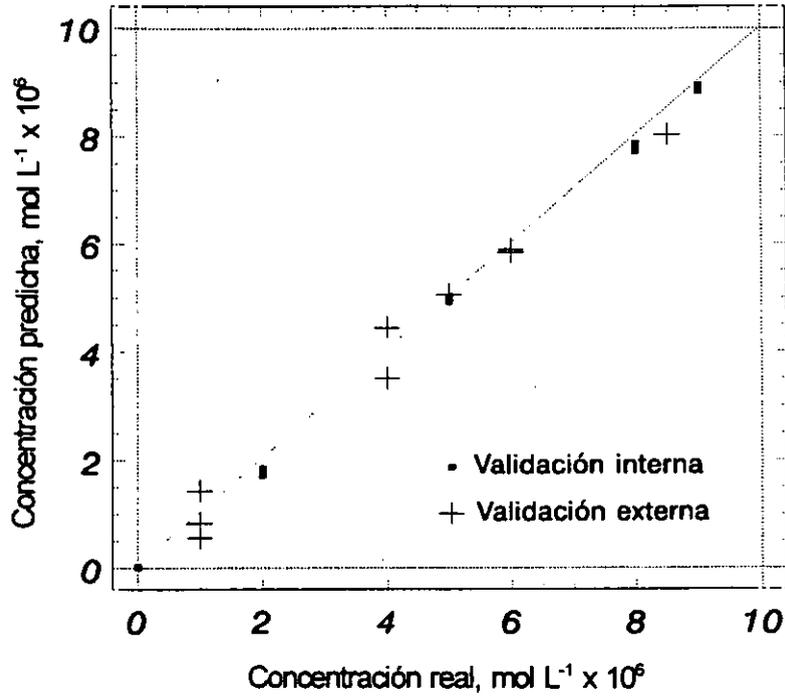


Figura 68

Relación entre la concentración calculada mediante el modelo de red neuronal propuesto y la concentración real de tiram para los conjuntos de validación interna y externa.

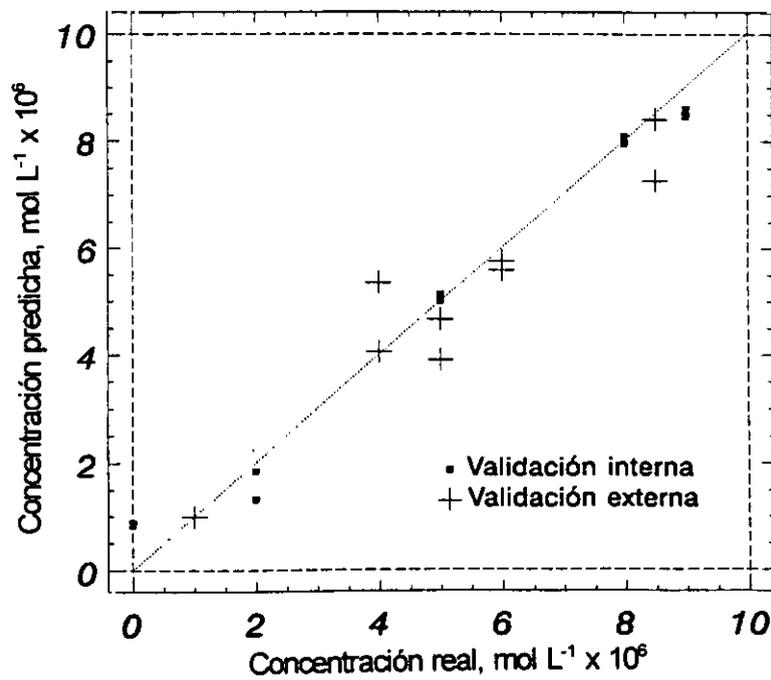


Figura 69

Relación entre la concentración calculada mediante el modelo de red neuronal propuesto y la concentración real de disulfiram para los conjuntos de validación interna y externa.

En las Figuras 68 y 69 se muestran las relaciones existentes entre la concentración calculada y la real para cada compuesto en las condiciones óptimas.

Como conclusión, puede decirse que el uso de redes neuronales produce una mejora de los resultados obtenidos por lo que se refiere a la predicción cuantitativa de las mezclas de los dos fungicidas estudiados. Esta mejora puede ser debida a una pérdida de linealidad en la señal analítica obtenida para la medida voltamperométrica de dichas mezclas.

III.4.- DESARROLLO DE ELECTRODOS COMPOSITOS DE GRAFITO-POLI(TETRAFLUOROETILENO) -TEFLON-. DETERMINACION VOLTAMPEROMETRICA DE TIRAM Y DISULFIRAM

En el capítulo III.1, se ha puesto de manifiesto en varias ocasiones la necesidad de desarrollar nuevos materiales electródicos que presenten características apropiadas tanto para su empleo como electrodos voltamperométricos, como especialmente como detectores en sistemas en flujo. En este contexto, los electrodos compósitos de grafito-poli(tetrafluoroetileno) -teflón- ofrecen una resistencia mecánica y química mucho mayor que los electrodos de pasta de carbono, mientras que mantienen las principales ventajas derivadas de su naturaleza compósita, como una relación señal/ruido mucho más favorable que la que se da en los electrodos sólidos convencionales [2].

En este capítulo se ha fabricado y puesto a punto un electrodo compósito de grafito-teflón y se ha estudiado el comportamiento voltamperométrico en oxidación de los fungicidas tiram y disulfiram sobre este tipo de electrodo con objeto de verificar las características de dichos electrodos compósitos como electrodos voltamperométricos.

III.4.1.- COMPORTAMIENTO VOLTAMPEROMETRICO MEDIANTE BARRIDO LINEAL

Puesto que los fungicidas estudiados ofrecen una buena señal de oxidación sobre los electrodos de pasta de carbono modificados con CoPC en medios aproximadamente neutros (apartado III.1.2.2), se ha decidido emplear como medio de trabajo para las investigaciones preliminares sobre los electrodos de grafito-teflón, regulador $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0.1 mol L⁻¹ de pH 7.4 tanto para el tiram como para el disulfiram.

En primer lugar, se procedió a observar la respuesta de un electrodo de grafito-40% teflón sumergido en una disolución de tiram en el medio indicado, cuando se realiza un barrido de potencial entre 0.0 y +1.2 V mediante voltamperometría de barrido lineal (LSV). No se obtuvo ninguna señal de oxidación apreciable para concentraciones de fungicida inferiores a $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Solamente a niveles de concentración de tiram superiores a $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ puede observarse un pico de oxidación bien definido (Figura 70).

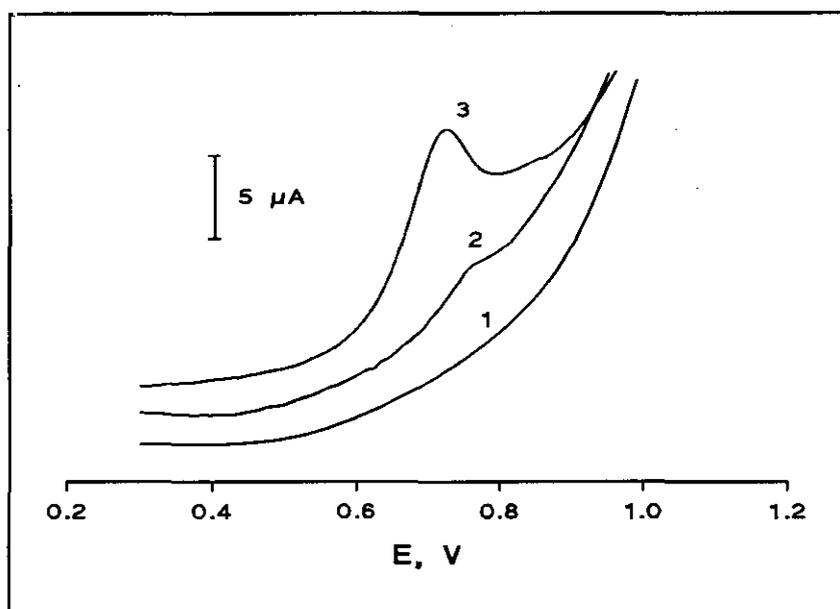


Figura 70

Voltamperogramas, en LSV, sobre un electrodo compuesto de grafito-teflón de disoluciones de tiram (1) $5.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, (2) 1.0×10^{-5} y (3) $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0.1 mol L^{-1} , pH 7.4; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

En el caso del disulfiram los resultados fueron similares, no observándose un pico de oxidación bien definido sobre el electrodo compuesto de grafito-40% de teflón hasta que la concentración de fungicida en disolución era superior a $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

III.4.2.- ADSORCION DE LOS FUNGICIDAS SOBRE EL ELECTRODO COMPOSITO

En el capítulo III.1 de esta Memoria se ha demostrado que, tanto el tiram como el disulfiram, se adsorben a circuito abierto sobre la superficie de los electrodos de pasta de carbono modificados con ftalocianina de cobalto, habiéndose aprovechado esta circunstancia con fines de preconcentración de los analitos.

Basándonos en estos resultados, se investigó la posibilidad de que el proceso de adsorción de estos fungicidas tuviese también lugar sobre la superficie de los electrodos compósitos de grafito-teflón. Para ello, se emplearon disoluciones de los fungicidas 1.0×10^{-5} mol L⁻¹ en medio regulador fosfato 0.1 mol L⁻¹ de pH 7.4, aplicando un período de acumulación a circuito abierto de 300 segundos. A continuación se barrió linealmente el potencial entre 0.0 V y +1.2 V.

Tanto en el caso del tiram (Figura 71) como del disulfiram (Figura 72), se observa un fuerte aumento en la intensidad del pico correspondiente si se comparan con los voltamperogramas obtenidos sin ningún tiempo de acumulación, como resultado de la adsorción de los fungicidas sobre la superficie del electrodo.

Puesto que no se ha apreciado dependencia alguna de la intensidad de pico con el potencial aplicado al electrodo durante el período de acumulación, se escogió, para ambos fungicidas, un potencial de acumulación de 0.0 V, que coincide con el potencial inicial de barrido de los voltamperogramas.

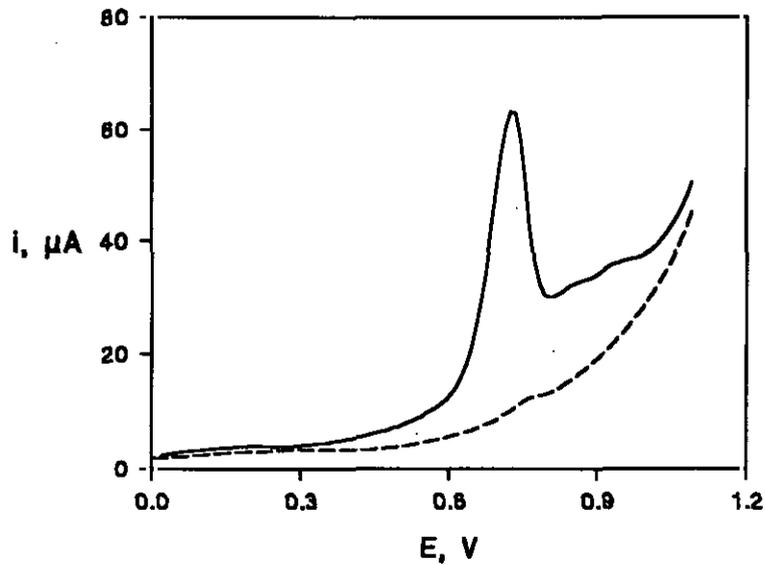


Figura 71

Voltamperogramas, en LSV, de tiram 1.0×10^{-5} mol L⁻¹ sobre un electrodo compuesto de grafito-40% teflón; H₂PO₄⁻/HPO₄²⁻ 0.1 mol L⁻¹, pH 7.4. (----) sin acumulación, (—) con un período de acumulación de 300 segundos; $v = 50$ mV s⁻¹.

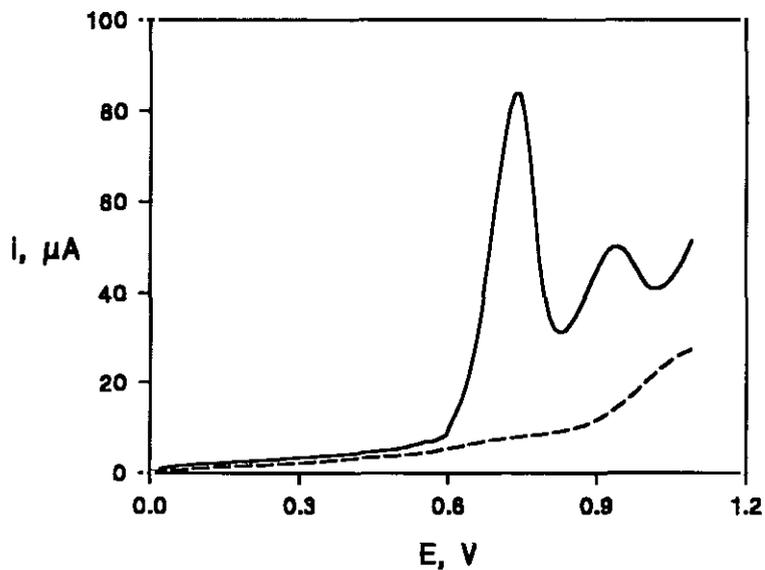


Figura 72

Voltamperogramas, en LSV, de disulfiram 1.0×10^{-5} mol L⁻¹ sobre un electrodo compuesto de grafito-40% teflón; H₂PO₄⁻/HPO₄²⁻ 0.1 mol L⁻¹, pH 7.4. (----) sin acumulación, (—) con un período de acumulación de 300 segundos; $v = 50$ mV s⁻¹.

III.4.2.1.- Optimización de la composición del electrodo

La relación grafito-teflón se ha optimizado mediante voltamperometría de barrido lineal, empleando en todos los casos un período de acumulación de 5 minutos a 0.0 V.

Así, en el caso del tiram, en la Figura 73 y en la Tabla XXXIX se muestran los resultados obtenidos para una disolución 5.0×10^{-6} mol L⁻¹ del fungicida, en medio fosfato 0.1 mol L⁻¹ de pH 7.4, cuando se emplean electrodos compósitos fabricados con mezclas de grafito y teflón de diferentes proporciones. En el caso del disulfiram, los resultados correspondientes se recogen en la Tabla XL y se representan en la Figura 74.

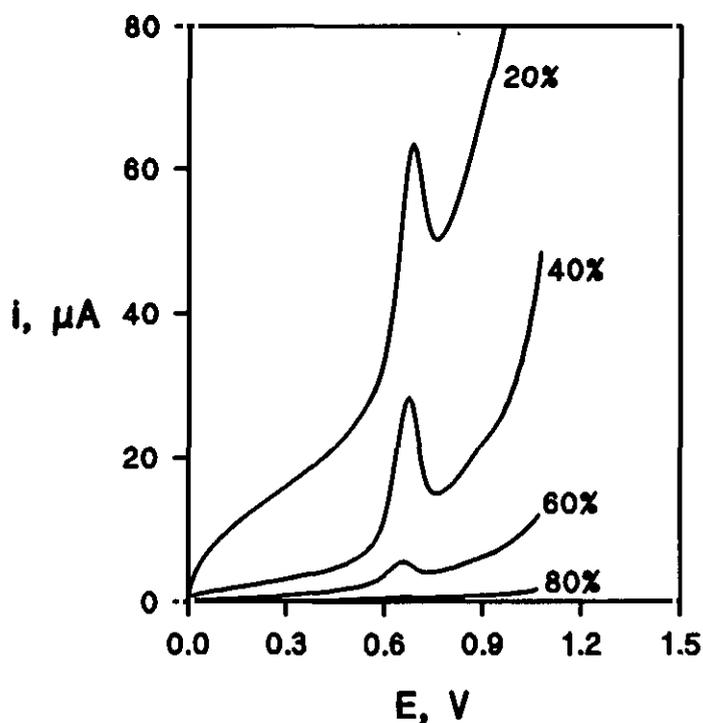


Figura 73

Voltamperogramas de barrido lineal de tiram 5.0×10^{-6} mol L⁻¹ sobre electrodos compósitos de grafito-teflón con porcentajes de teflón diferentes; $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0.1 mol L⁻¹, pH 7.4; $t_{ac} = 300$ s; $E_{ac} = 0.0$ V; $v = 50$ mV s⁻¹.

Tabla XXXIX

Influencia de la proporción de teflón en el electrodo compuesto sobre la señal de oxidación de tiram $5.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ mediante voltamperometría de barrido lineal. $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0.1 mol L^{-1} , pH 7.4; $t_{ac} = 300 \text{ s}$; $E_{ac} = 0.0 \text{ V}$; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

% Teflón	$i_{\text{TOTAL}}, \mu\text{A}$	$i_{\text{FONDO}}, \mu\text{A}$	$i_{\text{TOTAL}}/i_{\text{FONDO}}$
20	63.4	22.7	2.8
40	28.5	4.4	6.5
60	5.5	1.3	4.2
80	0.64	0.27	2.4

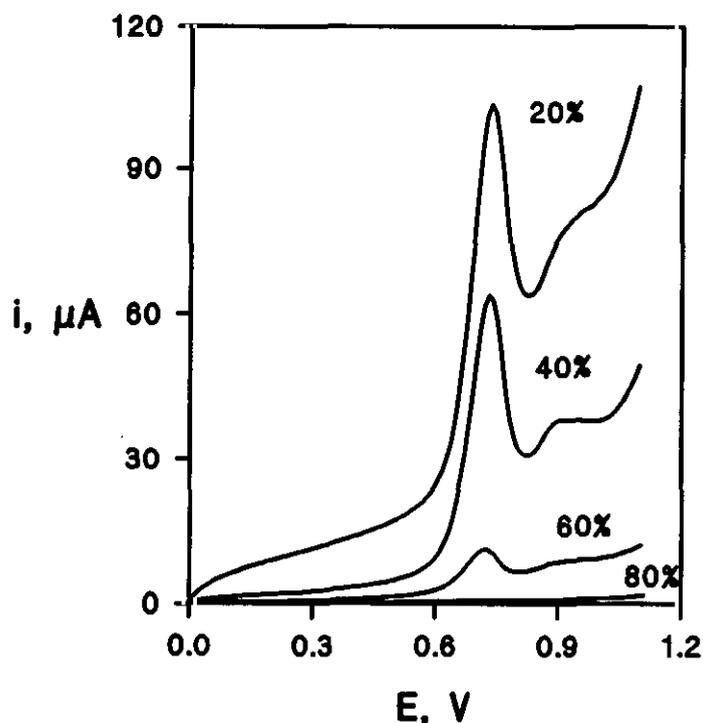


Figura 74

Voltamperogramas de barrido lineal de disulfiram $5.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ sobre electrodos compósitos de grafito-teflón con porcentajes de teflón diferentes; $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0.1 mol L^{-1} , pH 7.4; $t_{ac} = 300 \text{ s}$; $E_{ac} = 0.0 \text{ V}$; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Tabla XL

Influencia de la proporción de teflón en el electrodo compuesto sobre la señal de oxidación de disulfiram $5.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ mediante voltamperometría de barrido lineal. $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0.1 mol L^{-1} , pH 7.4; $t_{ac} = 300 \text{ s}$; $E_{ac} = 0.0 \text{ V}$; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

% Teflón	$i_{\text{TOTAL}}, \mu\text{A}$	$i_{\text{FONDO}}, \mu\text{A}$	$i_{\text{TOTAL}}/i_{\text{FONDO}}$
20	103.5	16.3	6.4
40	39.5	2.9	13.6
60	17.6	1.6	11.4
80	4.0	0.54	7.4

Como puede observarse, tanto la corriente de oxidación de ambos fungicidas como la corriente de fondo disminuyen al aumentar el porcentaje de teflón en el electrodo. En ambos casos, la máxima relación señal-ruido se obtuvo con el electrodo que contiene un 40% de teflón.

Por otra parte, para escoger la proporción óptima de fase aislante también es necesario considerar que la resistencia mecánica de las pastillas resultantes disminuye a medida que lo hace la proporción de teflón en el material compuesto. Se ha comprobado que las pastillas fabricadas con mezclas que contienen un 40% de teflón presentan una resistencia mecánica suficiente para su manipulación y empleo como electrodos voltamperométricos. Así, por ejemplo, va a ser posible cortar diversas porciones a partir de la pastilla original y lijar la superficie del electrodo para su regeneración manteniendo la integridad del material compuesto. Estos resultados contradicen lo sugerido por Klatt y col. [55] quienes recomendaban altos contenidos en teflón (90-85%).

Teniendo en cuenta estos resultados, se ha decidido utilizar electrodos indicadores fabricados con mezclas que contienen un 60% de grafito y un 40% de teflón.

En la Figura 75 se muestra un micrografía de barrido electrónico de la superficie de uno de estos electrodos, donde pueden observarse claramente las características propias de compuesto consolidado de este material.

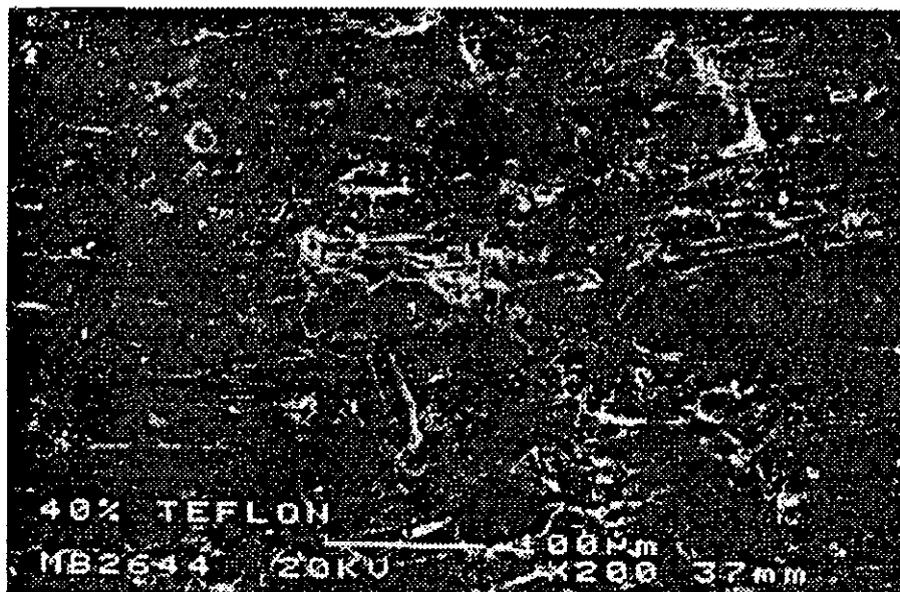


Figura 75

Micrografía de barrido electrónico de la superficie de una pastilla de grafito-40% teflón

III.4.2.2.- Regeneración electroquímica de la superficie electródica

Se ha comprobado que es posible regenerar electroquímicamente la superficie del electrodo después de cada medida mediante la aplicación de un potencial de -1.2 V durante 30 segundos. Este potencial de limpieza se escogió a partir de los voltamperogramas cíclicos de tiram y disulfiram, registrados tras la preconcentración de los fungicidas sobre la superficie del electrodo durante 300 segundos. A modo de ejemplo, en la Figura 76 se muestra el voltamperograma cíclico obtenido para el tiram.

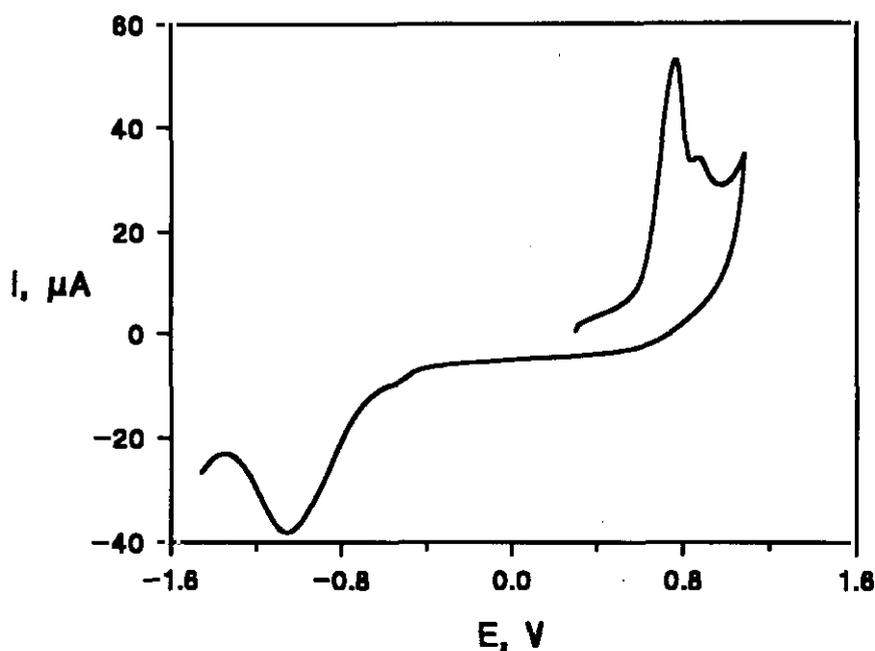


Figura 76

Voltamperograma cíclico de tiram 1.0×10^{-5} mol L⁻¹ sobre un electrodo compuesto de grafito-40% teflón; H₂PO₄⁻/HPO₄²⁻ 0.1 mol L⁻¹, pH 7.4; $t_{\text{c}} = 300$ s; $E_{\text{sc}} = 0.0$ V; $v = 50$ mV s⁻¹.

Puesto que aparece un pico catódico a -1.08 V en el caso del tiram y a -1.17 V en el caso del disulfiram, se escogió un potencial de -1.2 V para la limpieza electroquímica del electrodo compuesto. La aplicación de este potencial durante 30 segundos es suficiente para conseguir una regeneración efectiva de la superficie electródica, lo que constituye una gran ventaja con respecto al empleo de los electrodos de pasta de carbono modificados con CoPC desarrollados en el capítulo III.1 de esta Memoria, donde era necesario renovar la superficie del electrodo con pasta nueva después de cada medida.

III.4.2.3.- Comportamiento voltamperométrico mediante barrido lineal

Los voltamperogramas de barrido lineal obtenidos sobre el electrodo compuesto de grafito-40% teflón para tiram y disulfiram muestran uno o dos picos de oxidación dependiendo de la concentración de fungicida. El primero de ellos, que es también el más intenso, aparece en ambos casos a un potencial unos 200 mV menos positivo que los picos de oxidación obtenidos para estos fungicidas sobre un electrodo de pasta de carbono en las mismas condiciones de trabajo, como se puede ver en las Figuras 77 y 78. Además, es evidente que la corriente de pico es, en ambos casos, mucho más alta sobre el electrodo compuesto.

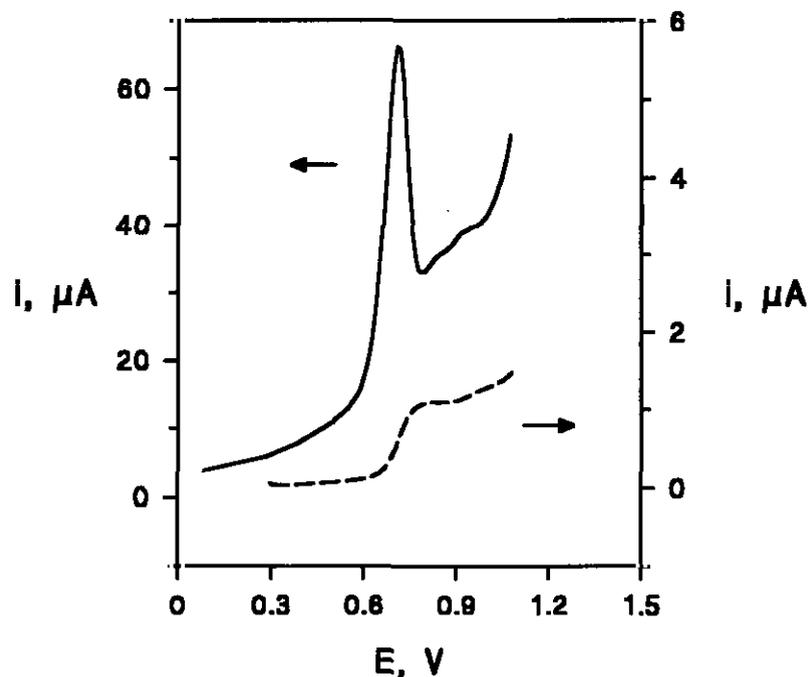


Figura 77

Voltamperogramas, en LSV, de tiram 1.0×10^{-5} mol L⁻¹ sobre: (—) un electrodo compuesto de grafito-40% teflón, (-----) un electrodo de pasta de carbono; $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0.1 mol L⁻¹, pH 7.4; $t_{ac} = 300$ s; $E_{ac} = 0.0$ V; $v = 50$ mV s⁻¹.

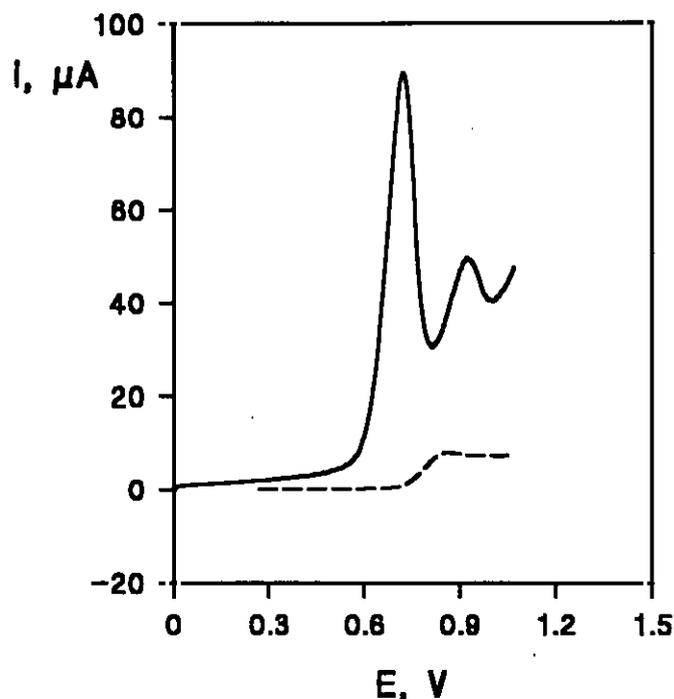


Figura 78

Voltamperogramas, en LSV, de disulfiram 1.0×10^{-5} mol L⁻¹ sobre: (—) un electrodo compuesto de grafito-40% teflón, (----) un electrodo de pasta de carbono; $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0.1 mol L⁻¹, pH 7.4; $t_{ac} = 300$ s; $E_{ac} = 0.0$ V; $v = 50$ mV s⁻¹.

Los voltamperogramas que se representan en estas figuras han sido registrados tras la aplicación de un periodo de acumulación de 5 minutos, confirmándose de nuevo que los procesos de adsorción de los fungicidas sobre la superficie del electrodo compuesto de grafito-teflón pueden aprovecharse como una etapa de preconcentración efectiva previa a la medida cuantitativa de las señales de oxidación de tiram y disulfiram.

La optimización de las distintas condiciones de trabajo que afectan a las señales voltamperométricas de ambos fungicidas, tras su adsorción sobre la superficie del electrodo de grafito-teflón, se ha realizado mediante voltamperometría de barrido lineal empleando una velocidad de barrido de potencial de 50 mV s⁻¹.

III.4.2.3.1.- Efecto del pH

La influencia del pH sobre el potencial y la intensidad de los picos de oxidación de tiram y disulfiram se ha examinado para cada fungicida a un nivel de concentración de $5.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, utilizando un electrodo compuesto de grafito-40% teflón y un período de acumulación de 300 segundos a 0.0 V, en medio regulador Britton-Robinson 0.1 mol L^{-1} , cubriendo el intervalo de pH desde 1.5 hasta 11.9. En estas condiciones, el segundo pico menos intenso mencionado anteriormente es tan pequeño que no se puede medir con precisión.

Tabla XLI

Influencia del pH sobre la intensidad de pico, i_p , y el potencial de pico, E_p , de tiram, en LSV, sobre un electrodo de grafito-40% teflón. Tiram $5.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; Britton-Robinson 0.1 mol L^{-1} ; tiempo de acumulación: 300 s; $E_{ac} = 0.0 \text{ V}$; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

pH	i_p , μA	E_p , V
1.7	10.9	0.783
2.1	15.8	0.783
3.2	18.7	0.774
4.1	24.5	0.764
5.1	24.9	0.744
6.1	27.4	0.730
7.1	28.5	0.720
8.1	28.5	0.710
9.0	28.9	0.705
9.9	30.5	0.695
11.1	29.8	0.680
11.9	16.9	0.675

En el caso del tiram, los resultados aparecen recogidos en la Tabla XLI y se representan en la Figura 79. Al aumentar el valor del pH se observa un desplazamiento del potencial de pico hacia valores menos positivos, lo que indica la existencia de una reacción de protonación acoplada al proceso de oxidación del fungicida. No se observó ningún punto de corte claro en esta representación a pesar de haberse encontrado en la bibliografía [1] un valor de pK' de 6.0 para este fungicida. Por otro lado, la intensidad de pico aumenta con el pH hasta pH 6.0, permaneciendo prácticamente constante para valores de pH superiores hasta pH 11.1. En medios más básicos se observa una brusca disminución de la intensidad de pico, probablemente como consecuencia de la hidrólisis del tiram en medio alcalino.

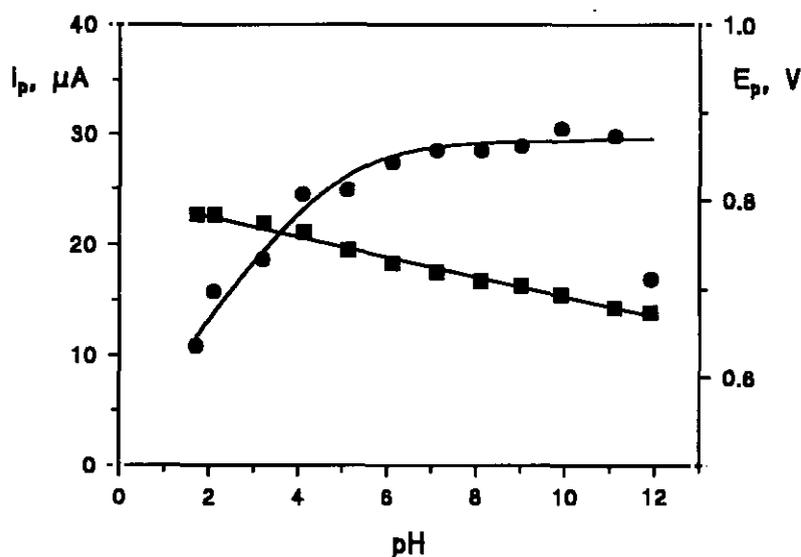


Figura 79

Influencia del pH sobre i_p (●) y E_p (■), en LSV, de tiram 5.0×10^{-6} mol L^{-1} sobre un electrodo de grafito-40% teflón; Britton-Robinson 0.1 mol L^{-1} ; tiempo de acumulación: 300 s; $E_{ac} = 0.0$ V; $v = 50$ mV s^{-1} .

Por lo que respecta al disulfiram, los resultados de este estudio se recogen en la Tabla XLII y se muestran en la Figura 80. La representación del potencial de pico frente al pH da lugar ahora a dos tramos lineales con distinta pendiente cuya

intersección tiene lugar a pH 5.7, valor que podría corresponder al pK_a del disulfiram adsorbido. La variación de la intensidad de pico con el pH es muy similar a la observada para el tiram. La intensidad de pico aumenta al disminuir la acidez del medio, más fuertemente en la zona de pH comprendida entre 5.1 y 7.1, para mantenerse prácticamente constante entre pH 7.1 y pH 11.1 y volver a disminuir bruscamente a pH 11.9, probablemente como consecuencia de la inestabilidad de la disolución del fungicida, al igual que ocurría en el caso del tiram.

Tabla XLII

Influencia del pH sobre la intensidad de pico, i_p , y el potencial de pico, E_p , de disulfiram, en LSV, sobre un electrodo de grafito-40% teflón. Disulfiram $5.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; Britton-Robinson 0.1 mol L^{-1} ; tiempo de acumulación: 300 s; $E_{ac} = 0.0 \text{ V}$; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

pH	i_p , μA	E_p , V
1.5	6.60	0.837
2.1	10.87	0.823
3.1	12.72	0.810
4.1	15.75	0.780
5.1	17.38	0.760
6.1	23.44	0.740
7.1	35.77	0.734
8.1	35.24	0.724
9.0	37.26	0.714
10.0	34.38	0.704
11.1	34.88	0.684
11.9	13.50	0.670

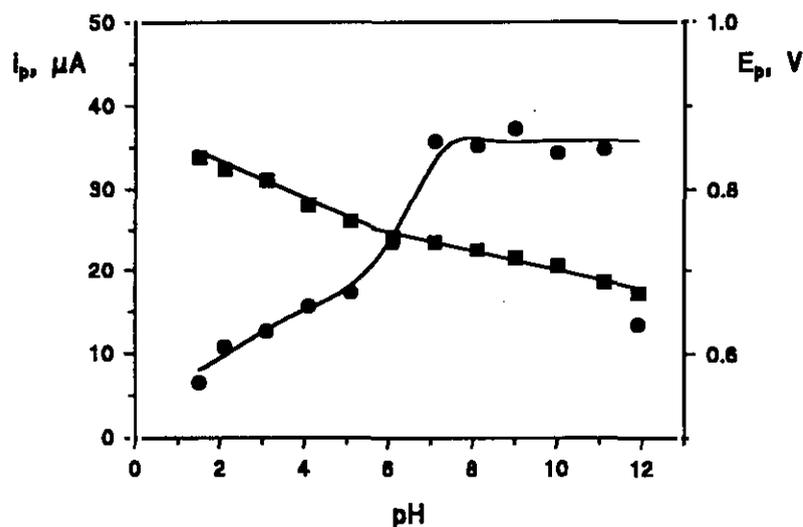


Figura 80

Influencia del pH sobre i_p (●) y E_p (■), en LSV, de disulfiram $5.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ sobre un electrodo de grafito-40% teflón; Britton-Robinson 0.1 mol L^{-1} ; tiempo de acumulación: 300 s; $E_{bc} = 0.0 \text{ V}$; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Este comportamiento con el pH parece indicar que se produce una adsorción más eficiente de las correspondientes formas desprotonadas de ambos fungicidas.

Teniendo en cuenta estos resultados, se ha considerado apropiado para estudios posteriores el medio constituido por regulador fosfato 0.1 mol L^{-1} de pH 7.4, tanto para el tiram como para el disulfiram.

III.4.2.3.2.- Influencia del tiempo de acumulación

La dependencia de la corriente de pico con el período de acumulación se ha estudiado para cada fungicida a tres niveles de concentración: 1.0×10^{-5} , 5.0×10^{-6} y $5.0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. Los resultados obtenidos para el tiram se recogen en las Tablas XLIII, XLIV y XLV, y se representan en las Figuras 81 y 82.

Tabla XLIII

Influencia del tiempo de acumulación sobre la intensidad del pico de oxidación de tiram, en LSV, sobre un electrodo de grafito-40% teflón. Tiram 1.0×10^{-5} mol L^{-1} ; $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ 0.1 mol L^{-1} , pH 7.4; $E_{ac} = 0.0$ V; $v = 50$ mV s^{-1} .

t_{ac} , s	i_p , μA	t_{ac} , s	i_p , μA
0	-	210	34.2
30	9.9	240	36.3
60	15.8	270	38.4
90	20.5	300	40.0
120	24.8	360	43.7
150	28.7	600	59.1
180	31.7		

Tabla XLIV

Influencia del tiempo de acumulación sobre la intensidad del pico de oxidación de tiram, en LSV, sobre un electrodo de grafito-40% teflón. Tiram 5.0×10^{-6} mol L^{-1} ; $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ 0.1 mol L^{-1} , pH 7.4; $E_{ac} = 0.0$ V; $v = 50$ mV s^{-1} .

t_{ac} , s	i_p , μA
0	-
30	6.5
60	11.4
90	14.9
120	17.6
150	19.2
180	20.4
210	19.5
300	24.0
600	33.0

Tabla XLV

Influencia del tiempo de acumulación sobre la intensidad del pico de oxidación de tiram, en LSV, sobre un electrodo de grafito-40% teflón. Tiram 5.0×10^{-7} mol L⁻¹; H₂PO₄⁻/HPO₄²⁻ 0.1 mol L⁻¹, pH 7.4; E_{ac} = 0.0 V; v = 50 mV s⁻¹.

t _{ac} , s	i _p , μA
0	-
60	0.53
120	1.37
180	1.67
240	2.23
300	2.35
360	2.43
480	2.62
600	2.73

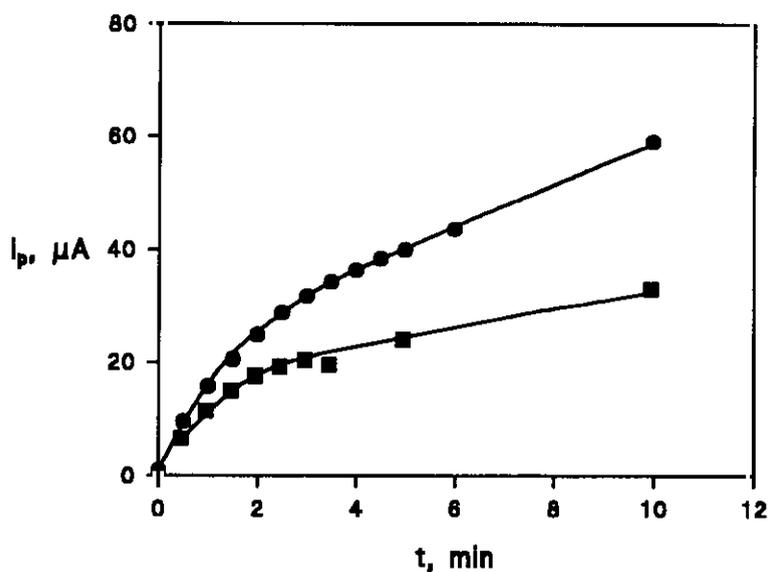
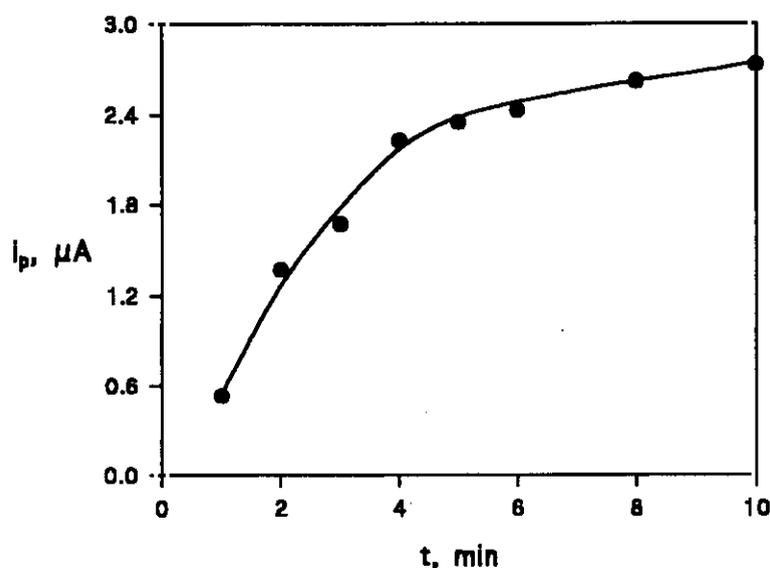


Figura 81

Influencia del tiempo de acumulación sobre la intensidad del pico de oxidación de tiram, en LSV, sobre un electrodo de grafito-40% teflón. Tiram (●) 1.0×10^{-5} mol L⁻¹, (■) 5.0×10^{-6} mol L⁻¹; H₂PO₄⁻/HPO₄²⁻ 0.1 mol L⁻¹, pH 7.4; E_{ac} = 0.0 V; v = 50 mV s⁻¹.

**Figura 82**

Influencia del tiempo de acumulación sobre la intensidad del pico de oxidación de tiram, en LSV, sobre un electrodo de grafito-40% teflón. Tiram 5.0×10^{-7} mol L^{-1} ; $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0.1 mol L^{-1} , pH 7.4; $E_{ac} = 0.0$ V; $v = 50$ mV s^{-1} .

Para una concentración de tiram 5.0×10^{-7} mol L^{-1} , la corriente de pico aumenta con el tiempo de acumulación hasta los 300 segundos, manteniéndose prácticamente constante para tiempos más largos. Sin embargo, para los dos intervalos de concentración superiores, la intensidad de pico aumenta en todo el intervalo de tiempos estudiado, aunque más acusadamente al principio y más suavemente por encima de 240 segundos.

En el caso del disulfiram, los resultados se recogen en las Tablas XLVI, XLVII y XLVIII, y se muestran en las Figuras 83 y 84. Como puede observarse, la corriente de pico aumenta con el tiempo de acumulación en el intervalo de tiempos comprendido entre 0 y 20 minutos para todos los niveles de concentración ensayados, aunque, como en el caso del tiram, la pendiente de las curvas i_p - t_{ac} va disminuyendo conforme aumenta el tiempo de acumulación.

Tabla XLVI

Influencia del tiempo de acumulación sobre la intensidad del pico de oxidación de disulfiram, en LSV, sobre un electrodo de grafito-40% teflón. Disulfiram 1.0×10^{-5} mol L⁻¹; H₂PO₄⁻/HPO₄²⁻ 0.1 mol L⁻¹, pH 7.4; E_{ac} = 0.0 V; v = 50 mV s⁻¹.

t _{ac} , min	i _p , μA
0	-
1	19.2
2	33.0
3	43.6
4	53.1
5	61.4
10	88.6
15	105.5
20	117.7

Tabla XLVII

Influencia del tiempo de acumulación sobre la intensidad del pico de oxidación de disulfiram, en LSV, sobre un electrodo de grafito-40% teflón. Disulfiram 5.0×10^{-6} mol L⁻¹; H₂PO₄⁻/HPO₄²⁻ 0.1 mol L⁻¹, pH 7.4; E_{ac} = 0.0 V; v = 50 mV s⁻¹.

t _{ac} , min	i _p , μA	t _{ac} , min	i _p , μA
0	-	7	56.3
1	13.8	8	60.2
2	24.4	9	63.7
3	32.6	10	69.6
4	40.0	15	85.0
5	45.8	20	96.5
6	50.6		

Tabla XLVIII

Influencia del tiempo de acumulación sobre la intensidad del pico de oxidación de disulfiram, en LSV, sobre un electrodo de grafito-40% teflón. Disulfiram 5.0×10^{-7} mol L⁻¹; H₂PO₄⁻/HPO₄²⁻ 0.1 mol L⁻¹, pH 7.4; E_{ac} = 0.0 V; v = 50 mV s⁻¹.

t _{ac} , min	i _p , μA	t _{ac} , min	i _p , μA
0	-	6	7.09
1	1.54	8	8.63
2	2.75	10	10.1
3	4.16	15	13.0
4	5.44	20	15.2
5	6.25		

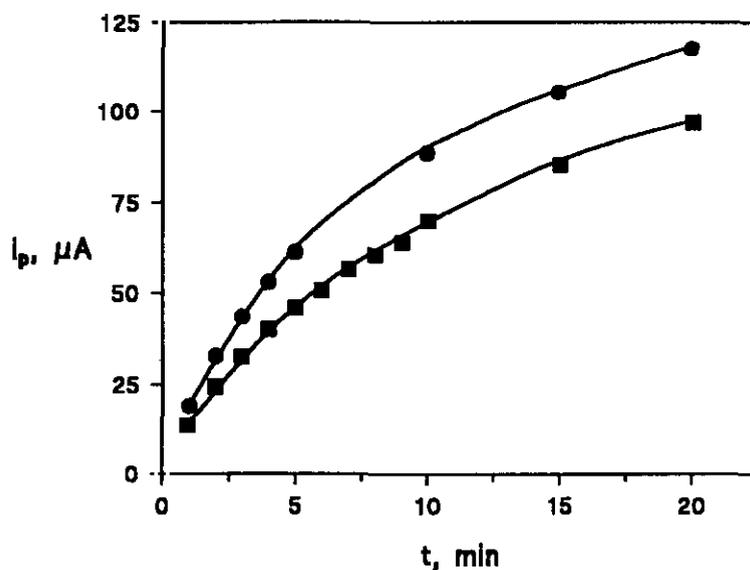


Figura 83

Influencia del tiempo de acumulación sobre la intensidad del pico de oxidación de disulfiram, en LSV, sobre un electrodo de grafito-40% teflón. Disulfiram (●) 1.0×10^{-5} mol L⁻¹, (■) 5.0×10^{-6} mol L⁻¹; H₂PO₄⁻/HPO₄²⁻ 0.1 mol L⁻¹, pH 7.4; E_{ac} = 0.0 V; v = 50 mV s⁻¹.

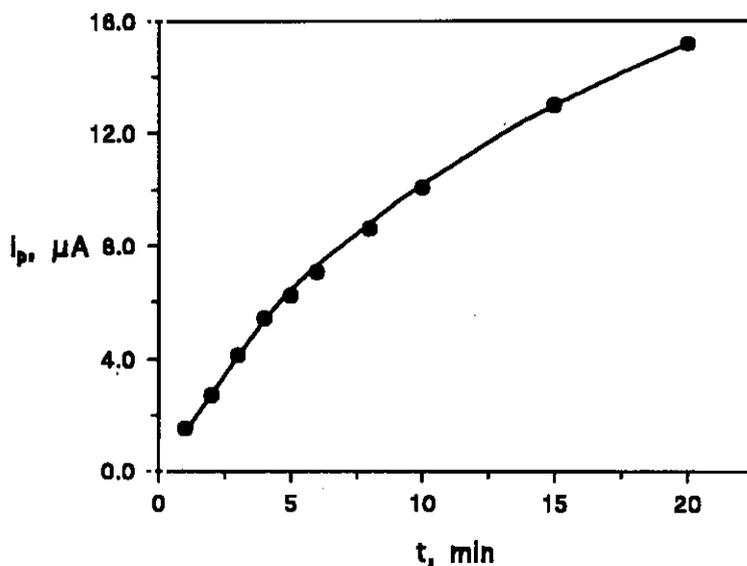


Figura 84

Influencia del tiempo de acumulación sobre la intensidad del pico de oxidación de disulfiram, en LSV, sobre un electrodo de grafito-40% teflón. Disulfiram 5.0×10^{-7} mol L⁻¹; H₂PO₄/HPO₄²⁻ 0.1 mol L⁻¹, pH 7.4; E_{ac} = 0.0 V; v = 50 mV s⁻¹.

Como un compromiso entre sensibilidad y tiempo de análisis se ha escogido, tanto para el tiram como para el disulfiram a cualquier nivel de concentración, un período de acumulación de 300 segundos.

Por otra parte, el período de acumulación no afectaba a los valores del potencial de pico en ningún caso.

III.4.2.3.3.- Efecto de la velocidad de barrido de potencial

La influencia de la velocidad de barrido de potencial, sobre la respuesta electroquímica de los fungicidas a un nivel de concentración de 5.0×10^{-6} mol L⁻¹, se ha estudiado mediante voltamperometría de barrido lineal, entre 5 y 1000 mV s⁻¹, tras la aplicación de un período de acumulación de 300 segundos a 0.0 V. Sólomente

se ha considerado su influencia sobre el primer pico que aparece en el voltamperograma por ser el de interés analítico.

Los resultados obtenidos para el tiram se muestran en la Tabla II y en las Figuras 85 y 86, mientras que para el disulfiram, los resultados se recogen en la Tabla L y se representan en las Figuras 87 y 88.

Tabla II

Influencia de la velocidad de barrido de potencial, en LSV, sobre la señal de oxidación de tiram 5.0×10^{-6} mol L⁻¹ sobre un electrodo de grafito-40% teflón. $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ 0.1 mol L⁻¹, pH 7.4; $t_{ac} = 300$ s; $E_{ac} = 0.0$ V.

v mV s ⁻¹	log v	i_p , μ A	log i_p	E_p , V	$i_p/Cv^{1/2}$ A L mol ⁻¹ mV ^{-1/2} s ^{1/2}
5	0.70	2.33	0.37	0.660	0.21
10	1.00	4.40	0.64	0.680	0.28
20	1.30	8.50	0.93	0.700	0.38
40	1.60	15.91	1.20	0.725	0.50
60	1.78	19.14	1.28	0.735	0.54
80	1.90	27.37	1.44	0.745	0.61
100	2.00	36.31	1.56	0.750	0.73
150	2.18	53.02	1.72	0.765	0.87
200	2.30	60.04	1.78	0.773	0.85
250	2.40	74.03	1.87	0.780	0.94
500	2.70	117.6	2.07	0.831	1.05
1000	3.00	171.5	2.23	0.885	1.08

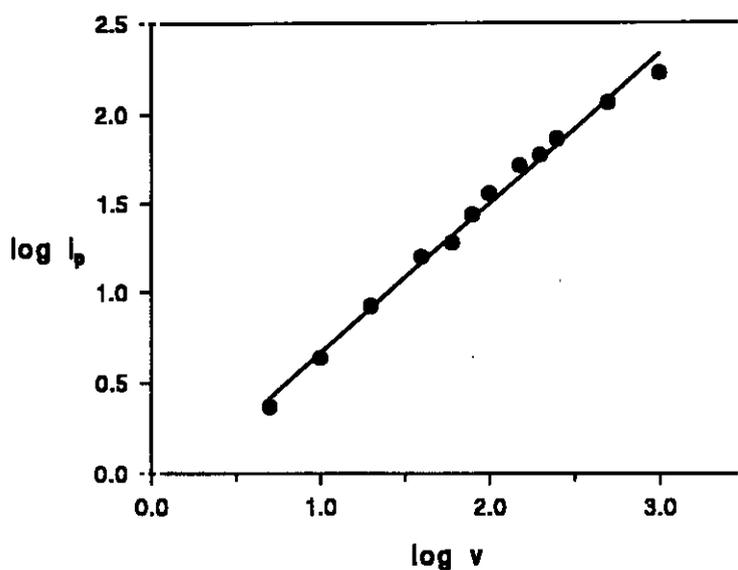


Figura 85

Variación del $\log i_p$ con $\log v$, mediante LSV, empleando un electrodo de grafito-40% teflón. Tiram $5.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0.1 mol L^{-1} , pH 7.4; $t_{ac} = 300 \text{ s}$; $E_{ac} = 0.0 \text{ V}$.

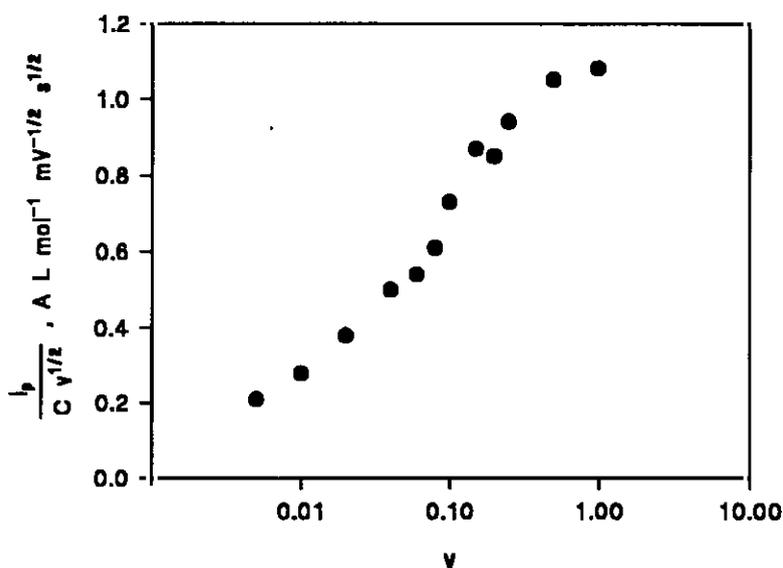


Figura 86

Variación de la función de corriente, $i_p/Cv^{1/2}$, con $\log v$, mediante LSV, empleando un electrodo de grafito-40% teflón. Tiram $5.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0.1 mol L^{-1} , pH 7.4; $t_{ac} = 300 \text{ s}$; $E_{ac} = 0.0 \text{ V}$.

Tabla L

Influencia de la velocidad de barrido de potencial, en LSV, sobre la señal de oxidación de disulfiram $5.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ sobre un electrodo de grafito-40% teflón. $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0.1 mol L^{-1} , pH 7.4; $t_{ac} = 300 \text{ s}$; $E_{ac} = 0.0 \text{ V}$.

v mV s^{-1}	$\log v$	$i_p, \mu\text{A}$	$\log i_p$	E_p, V	$i_p/Cv^{1/2}$ $\text{A L mol}^{-1} \text{mV}^{-1/2} \text{s}^{1/2}$
5	0.70	3.57	0.55	0.645	0.32
10	1.00	7.44	0.87	0.655	0.47
20	1.30	15.08	1.18	0.674	0.68
40	1.60	29.22	1.46	0.694	0.92
60	1.78	42.25	1.63	0.714	1.09
80	1.90	52.95	1.72	0.724	1.19
100	2.00	65.95	1.82	0.734	1.32
150	2.18	92.86	1.97	0.754	1.52
200	2.30	117.3	2.07	0.754	1.66
250	2.40	138.9	2.14	0.764	1.76
500	2.70	223.1	2.35	0.803	2.00
1000	3.00	344.7	2.54	0.853	2.18

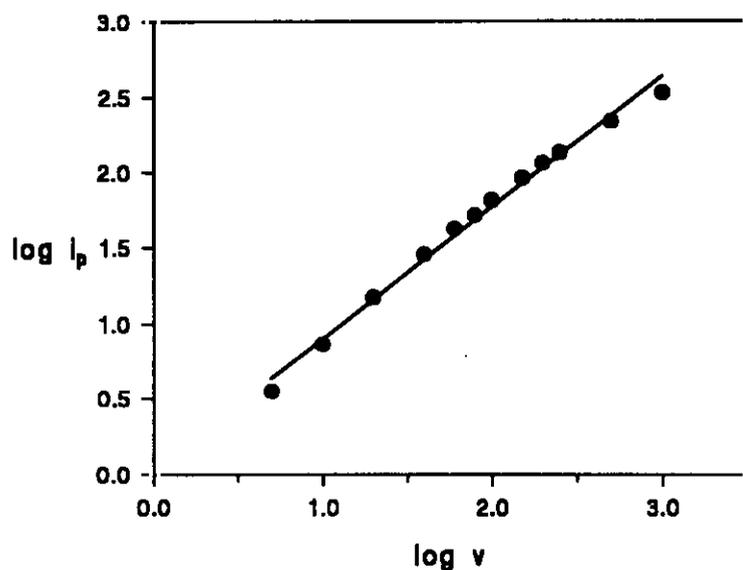


Figura 87

Variación del $\log i_p$ con $\log v$, mediante LSV, empleando un electrodo de grafito-40% teflón. Disulfiram 5.0×10^{-6} mol L⁻¹; H₂PO₄/HPO₄²⁻ 0.1 mol L⁻¹, pH 7.4; $t_{sc} = 300$ s; $E_{sc} = 0.0$ V.

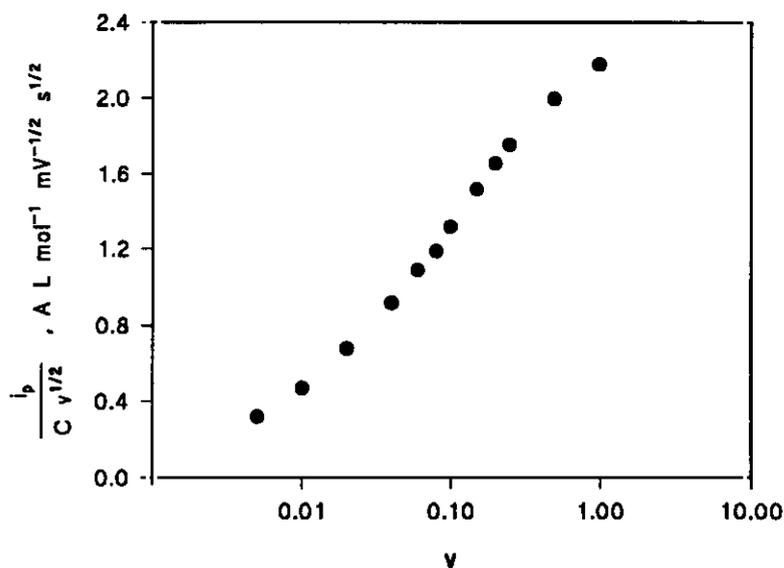


Figura 88

Variación de la función de corriente, $i_p/Cv^{1/2}$, con $\log v$, mediante LSV, empleando un electrodo de grafito-40% teflón. Disulfiram 5.0×10^{-6} mol L⁻¹; H₂PO₄/HPO₄²⁻ 0.1 mol L⁻¹, pH 7.4; $t_{sc} = 300$ s; $E_{sc} = 0.0$ V.

Las representaciones de $\log i_p$ frente a $\log v$ (Figuras 85 y 87) dan lugar a líneas rectas de pendiente próxima a 1 para ambos fungicidas (0.89 para tiram y 0.93 para disulfiram), como es de esperar cuando se produce adsorción del analito sobre la superficie del electrodo [198]. Además, el potencial de pico se desplaza en ambos casos hacia valores más positivos cuando aumenta la velocidad de barrido (Tablas IL y L), lo que sugiere una fuerte adsorción de los fungicidas sobre el electrodo compuesto [199].

La variación de la función de corriente, $i_p/Cv^{1/2}$ con la velocidad de barrido, también proporciona información sobre la naturaleza de las señales de oxidación de los fungicidas. Dicha función aumenta rápidamente al aumentar la velocidad de barrido de potencial para los dos compuestos (Figuras 86 y 88), siendo este comportamiento típico de los procesos en los que se produce adsorción del analito sobre la superficie del electrodo [170].

Todos estos datos indican que la fuerte adsorción de tiram y disulfiram sobre la superficie del electrodo compuesto es responsable de las señales de oxidación tan intensas que se obtienen para bajas concentraciones de los fungicidas mediante voltamperometría de barrido lineal. La adsorción sobre el electrodo de grafito-teflón es mucho más acusada que sobre los electrodos de pasta de carbono, modificados o no, probablemente como consecuencia de la existencia de cargas electrostáticas superficiales en el electrodo debidas a las partículas de teflón.

La fuerte adsorción de los fungicidas origina también un desplazamiento de unos 200 mV en el potencial de pico hacia valores menos positivos, respecto a las señales de oxidación obtenidas sobre un electrodo de pasta de carbono (Figuras 77 y 78), lo que contribuye a la mejora de la selectividad de las determinaciones de estos compuestos.

III.4.2.4.- Curvas de calibrado y características analíticas

Empleando un período de preconcentración de 300 segundos a 0.0 V y utilizando la técnica LSV con una velocidad de barrido de potencial de 50 mV s^{-1} , se han obtenido relaciones lineales entre la intensidad de pico y la concentración de tiram y disulfiram en los intervalos que aparecen recogidos en la Tabla LI. En esta tabla se recogen también las características de los calibrados, cuya representación gráfica se muestra en las Figuras 89-92.

Tabla LI

Curvas de calibrado para tiram y disulfiram, mediante LSV, empleando un electrodo de grafito-40% teflón. $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0.1 mol L^{-1} , pH 7.4; $t_{ac} = 300 \text{ s}$; $E_{ac} = 0.0 \text{ V}$; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Fungicida	Intervalo lineal, mol L^{-1}	Coefficiente de correlación	Pendiente, $\mu\text{A L mol}^{-1}$ $\times 10^{-8}$	Ordenada en el origen, μA
Tiram	$1.0 \times 10^{-6} - 1.0 \times 10^{-5}$	0.9994	3.8 ± 0.1	1.2 ± 0.6
	$2.0 \times 10^{-7} - 1.0 \times 10^{-6}$	0.9990	4.7 ± 0.2	-0.2 ± 0.1
Disulfiram	$1.0 \times 10^{-6} - 8.0 \times 10^{-6}$	0.998	6.6 ± 0.4	4 ± 2
	$2.0 \times 10^{-7} - 1.0 \times 10^{-6}$	0.9997	10.1 ± 0.2	0.1 ± 0.1

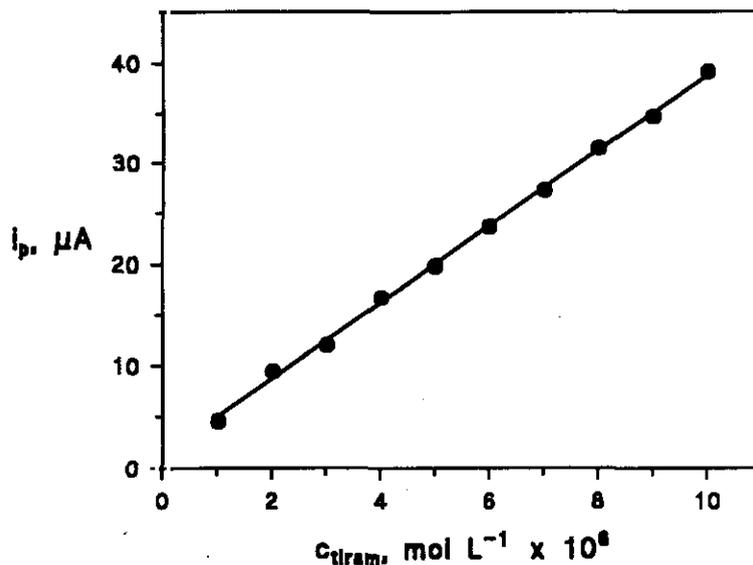


Figura 89

Influencia de la concentración de tiram sobre la intensidad de pico, i_p , en LSV, empleando un electrodo de grafito-40% teflón. Intervalo de concentración: 1.0×10^{-6} - 10.0×10^{-6} mol L⁻¹; $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0.1 mol L⁻¹, pH 7.4; $t_{sc} = 300$ s; $E_{sc} = 0.0$ V; $v = 50$ mV s⁻¹.

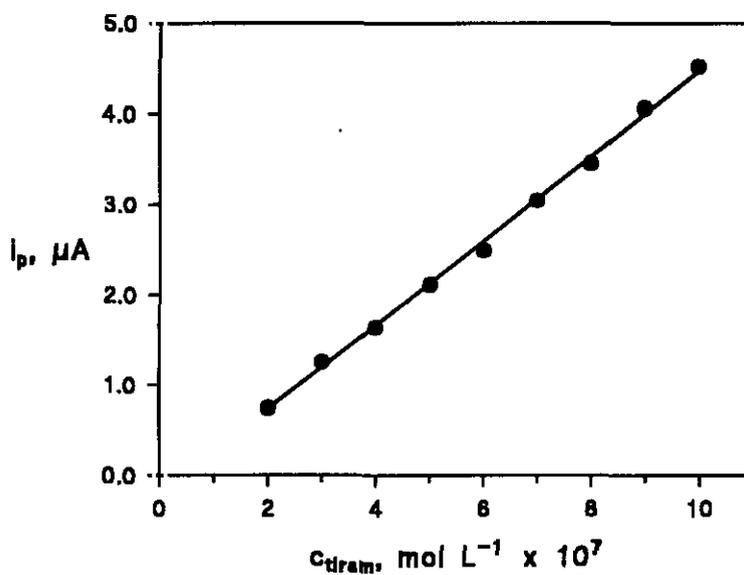


Figura 90

Influencia de la concentración de tiram sobre la intensidad de pico, i_p , en LSV, empleando un electrodo de grafito-40% teflón. Intervalo de concentración: 2.0×10^{-7} - 10.0×10^{-7} mol L⁻¹; $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0.1 mol L⁻¹, pH 7.4; $t_{sc} = 300$ s; $E_{sc} = 0.0$ V; $v = 50$ mV s⁻¹.

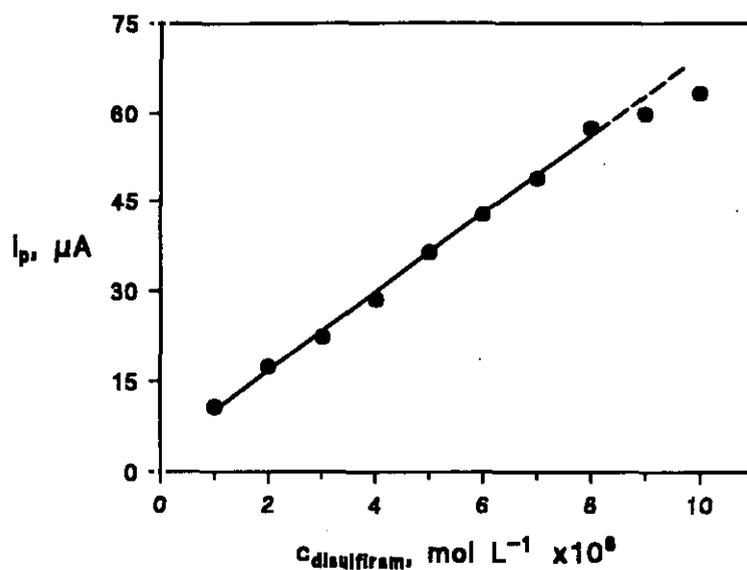


Figura 91

Influencia de la concentración de disulfiram sobre la intensidad de pico, i_p , en LSV, empleando un electrodo de grafito-40% teflón. Intervalo de concentración: 1.0×10^{-6} - 10.0×10^{-6} mol L⁻¹; $\text{H}_2\text{PO}_4/\text{HPO}_4^{2-}$ 0.1 mol L⁻¹, pH 7.4; $t_{sc} = 300$ s; $E_{sc} = 0.0$ V; $v = 50$ mV s⁻¹.

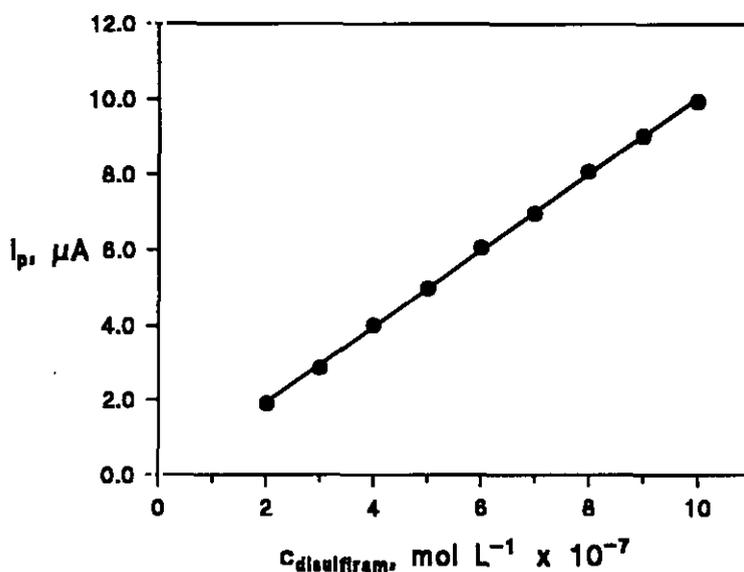


Figura 92

Influencia de la concentración de disulfiram sobre la intensidad de pico, i_p , en LSV, empleando un electrodo de grafito-40% teflón. Intervalo de concentración: 2.0×10^{-7} - 10.0×10^{-7} mol L⁻¹; $\text{H}_2\text{PO}_4/\text{HPO}_4^{2-}$ 0.1 mol L⁻¹, pH 7.4; $t_{sc} = 300$ s; $E_{sc} = 0.0$ V; $v = 50$ mV s⁻¹.

En ambos casos, la pendiente de las curvas de calibrado es mayor en el intervalo de concentraciones más pequeño considerado, como es de esperar cuando tienen lugar procesos de adsorción dado que, a concentraciones mayores, se aproxima el exceso superficial de los fungicidas al estado de saturación.

La desviación de la linealidad que indica la saturación de la superficie del electrodo se produce para concentraciones superiores a 1.0×10^{-5} mol L⁻¹ en el caso del tiram y a 8.0×10^{-6} mol L⁻¹ en el caso del disulfiram.

Las características analíticas de los métodos desarrollados, empleando las curvas de calibrado de la Tabla LI se resumen en la Tabla LII. Los valores de la desviación estándar relativa obtenidos para 10 alícuotas de cada fungicida a dos niveles de concentración diferentes ponen de manifiesto que los métodos desarrollados poseen una buena precisión.

Tabla LII

Características analíticas de los métodos desarrollados para la determinación de tiram y disulfiram, mediante LSV y preconcentración, empleando un electrodo de grafito-40% teflón. $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0.1 mol L⁻¹, pH 7.4; $t_{\text{ac}} = 300$ s; $E_{\text{sc}} = 0.0$ V; $v = 50$ mV s⁻¹.

Fungicida	RSD, %	Límite de determinación, mol L ⁻¹	Límite de detección, mol L ⁻¹
Tiram	2.0 ^a	1.8×10^{-7}	5.4×10^{-8}
	5.8 ^b		
Disulfiram	2.7 ^a	6.5×10^{-8}	2.0×10^{-8}
	2.2 ^b		

a) Nivel de concentración: 5.0×10^{-6} mol L⁻¹ (n=10)

b) Nivel de concentración: 3.0×10^{-7} mol L⁻¹ (n=10)

Los criterios para evaluar los límites de determinación y de detección de los métodos son los que se definieron en el Apartado III.1.5. Se ha tomado, en esta ocasión, como estimador de la desviación estándar del blanco, la calculada para una concentración 3.0×10^{-7} mol L⁻¹ de cada fungicida.

Es de destacar que los límites de determinación y de detección de los métodos desarrollados, empleando voltamperometría de barrido lineal y preconcentración, son similares en el caso del tiram y algo menores en el caso del disulfiram que los obtenidos, mediante DPV, con los electrodos de pasta de carbono modificados con ftalocianina de cobalto desarrollados en el capítulo III.1 de esta Memoria.

Es necesario mencionar ahora que las medidas llevadas a cabo para ambos fungicidas empleando voltamperometría diferencial de impulsos (DPV) y de onda cuadrada (SWV) tras la etapa de preconcentración, no ofrecieron ninguna ventaja respecto a la utilización de LSV, por lo que se escogió esta técnica para la caracterización de los electrodos y el desarrollo de los métodos de análisis.

III.4.2.5.- Estudio de interferencias

En este apartado se ha estudiado, al igual que se hizo en el capítulo correspondiente a la determinación de estos fungicidas con los electrodos modificados de pasta de carbono, el efecto producido por la presencia de diferentes sustancias que pueden encontrarse junto con estos fungicidas en diferentes tipos de muestras como por ejemplo aguas, sobre las señales de oxidación del tiram y del disulfiram, a un nivel de concentración de 1.0×10^{-6} mol L⁻¹, empleando el electrodo compuesto de grafito-40% teflón y utilizando un período de acumulación de 300 segundos a 0.0 V. En el caso del de tiram, los compuestos ensayados como potenciales interferentes han sido disulfiram, ziram, fenol y Zn(II), mientras que por

lo que se refiere al disulfiram, dichos interferentes fueron tiram, ziram, fenol y Zn(II).

En las condiciones experimentales utilizadas, puede observarse un pico de oxidación a 0.698 V para el ziram en concentración 1.0×10^{-5} mol L⁻¹. Sin embargo, una concentración de este fungicida de 1.0×10^{-6} mol L⁻¹ no da lugar a una señal analítica apreciable. La señal de oxidación del fenol aparece a 0.560 V, aunque sólo se obtiene un pico bien definido para una concentración 5.0×10^{-5} mol L⁻¹ o superior (Figura 93). Obviamente, el Zn(II) no presenta ninguna señal de oxidación en el intervalo de potenciales barrido.

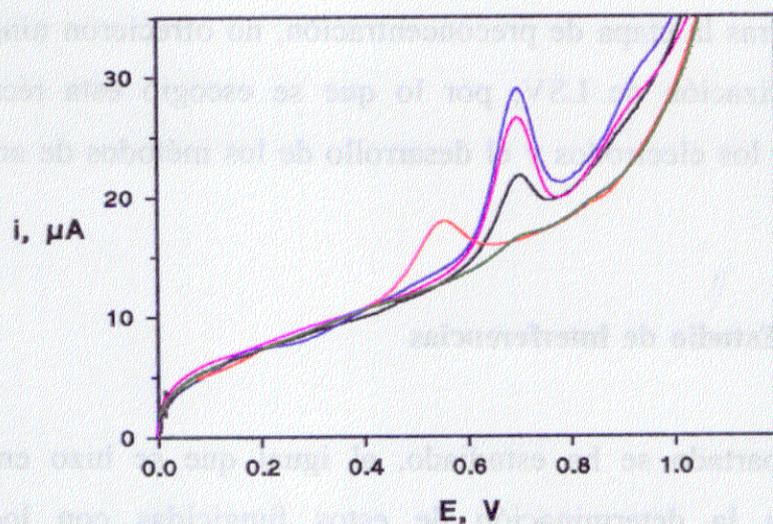


Figura 93

Voltamperogramas, en LSV, de: (—) fenol 5.0×10^{-5} mol L⁻¹, (—) disulfiram 1.0×10^{-6} mol L⁻¹, (—) tiram 1.0×10^{-6} mol L⁻¹, (—) ziram 1.0×10^{-5} mol L⁻¹, (—) ziram 1.0×10^{-6} mol L⁻¹, empleando un electrodo de grafito-40% teflón; $\text{H}_2\text{PO}_4/\text{HPO}_4^{2-}$ 0.1 mol L⁻¹, pH 7.4; t_{ac} = 300 s; E_{ac} = 0.0 V; v = 50 mV s⁻¹.

Dada la proximidad de las señales de oxidación que se obtienen para tiram, ziram y disulfiram, los voltamperogramas de mezclas binarias de estos fungicidas presentaron un solo pico global de oxidación. Por el contrario, los voltamperogramas de las mezclas de tiram con fenol y de disulfiram con fenol mostraron dos señales separadas, como se observa en las Figuras 94 y 95.

Con objeto de establecer el grado de interferencia de cada compuesto ensayado, se registraron los voltamperogramas de disoluciones de tiram o disulfiram 1.0×10^{-6} mol L⁻¹ y concentraciones variables del compuesto interferente. Los resultados se resumen en las Tablas LIII y LIV.

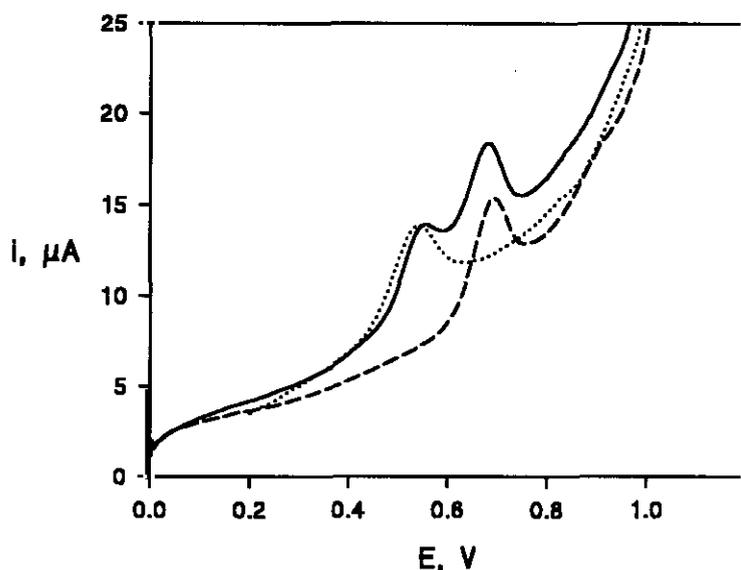


Figura 94

Voltamperogramas, en LSV, de (----) tiram 1.0×10^{-6} mol L⁻¹, (.....) fenol 5.0×10^{-5} mol L⁻¹, (—) mezcla de tiram 1.0×10^{-6} mol L⁻¹ y fenol 5.0×10^{-5} mol L⁻¹, sobre un electrodo de grafito-40% teflón. $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0.1 mol L⁻¹, pH 7.4; $t_{ac} = 300$ s; $E_{ac} = 0.0$ V; $v = 50$ mV s⁻¹.

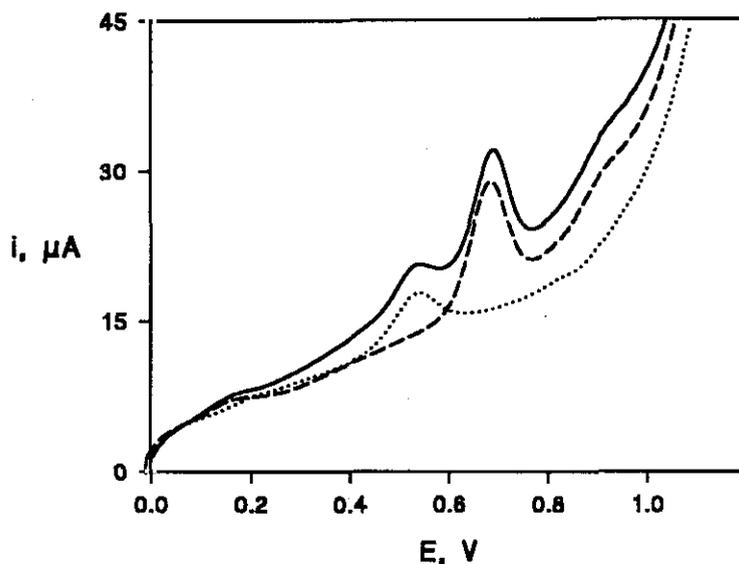


Figura 95

Voltamperogramas, en LSV, de (-----) disulfiram 1.0×10^{-6} mol L^{-1} , (.....) fenol 5.0×10^{-5} mol L^{-1} , (—) mezcla de disulfiram 1.0×10^{-6} mol L^{-1} y fenol 5.0×10^{-5} mol L^{-1} , sobre un electrodo de grafito-40% teflón. $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ 0.1 mol L^{-1} , pH 7.4; $t_{sc} = 300$ s; $E_{sc} = 0.0$ V; $v = 50$ mV s^{-1} .

Puesto que la corriente de oxidación del disulfiram es bastante mayor que la del tiram (Figura 93), la interferencia del disulfiram sobre la señal de oxidación del tiram es más acusada que al contrario. Como puede verse en las Tablas LIII y LIV, para una relación disulfiram:tiram 0.2:1, el error relativo en la medida de la corriente de pico para el tiram es superior al 10%, superando dicho error el 100% cuando la relación de concentraciones es 1:1. Sin embargo, para una relación tiram:disulfiram 0.2:1, el error relativo de la medida de i_p para el disulfiram es menor del 10%, mientras que con una relación 1:1, dicho error es del 45%.

Por lo que respecta al ziram, su señal de oxidación es considerablemente menor que la de tiram o disulfiram al mismo nivel de concentración (Figura 93) y, por consiguiente, su presencia sólo afecta significativamente a la medida de i_p a partir de las relaciones ziram:tiram 1:1 y ziram:disulfiram 5:1 o superior, respectivamente.

Tabla LIII

Influencia de la presencia de diversas sustancias sobre la intensidad de pico obtenida mediante LSV, para tiram 1.0×10^{-6} mol L^{-1} sobre un electrodo de grafito-40% teflón. $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ 0.1 mol L^{-1} , pH 7.4; $t_{ac} = 300$ s; $E_{ac} = 0.0$ V; $v = 50$ mV s^{-1} .

Relación interferente:tiram	i_p , μA			
	Sustancia interferente			
	Disulfiram	Ziram	Fenol	Zn(II)
0:1	4.39	4.48	4.48	5.07
0.2:1	4.88 (11.2)	4.70	-	-
0.4:1	5.74 (30.8)	4.60	-	-
0.6:1	7.34 (67.2)	4.65	-	-
0.8:1	8.27 (88.4)	4.60 (2.7)	-	-
1:1	9.08 (107)	5.47 (22.1)	4.37	5.11
2:1	-	6.48 (44.6)	4.55	5.09
5:1	-	10.9 (143)	4.42	5.05
10:1	-	-	4.55	4.94
50:1	-	-	4.80	5.08
100:1	-	-	4.59	5.02

En esta Tabla, los valores entre paréntesis representan el error relativo, en %, de la medida de la intensidad de pico de tiram.

Tabla LIV

Influencia de la presencia de diversas sustancias sobre la intensidad de pico obtenida mediante LSV, para disulfiram $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ sobre un electrodo de grafito-40% teflón. $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0.1 mol L^{-1} , pH 7.4; $t_{ac} = 300 \text{ s}$; $E_{ac} = 0.0 \text{ V}$; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Relación interferente:disulfiram	$i_p, \mu\text{A}$			
	Sustancia interferente			
	Tiram	Ziram	Fenol	Zn(II)
0:1	8.97	10.09	10.56	9.55
0.2:1	9.78 (9.0)	-	-	-
0.4:1	10.36 (15.5)	-	-	-
0.6:1	11.27 (25.6)	-	-	-
0.8:1	12.07 (34.4)	-	-	-
1:1	13.01 (45.0)	9.94	10.61	9.31
2:1	-	10.58 (4.8)	10.60	-
5:1	-	12.57 (24.6)	10.50	-
10:1	-	17.41 (72.5)	11.16	9.56
50:1	-	-	10.59	9.52
100:1	-	-	9.86	9.34

En esta Tabla, los valores entre paréntesis representan el error relativo, en %, de la medida de la intensidad de pico de disulfiram.

Por otro lado, la presencia de elevadas concentraciones de fenol tan sólo afectaron a la parte ascendiente de los voltamperogramas obtenidos para tiram o disulfiram (Figuras 94 y 95), no observándose interferencia para la medida de i_p de ambos fungicidas incluso cuando la relación fenol:tiram o fenol:disulfiram fue de 100:1, si se emplea una forma adecuada de medida de dicha corriente de pico.

Por último, como era de esperar, el Zn(II) no interfiere sobre la señal voltamperométrica de los fungicidas para ninguno de los niveles de concentración ensayados.

III.4.2.6.- Determinación de tiram en muestras de fresas contaminadas

Como aplicación de los métodos desarrollados utilizando los procesos de adsorción de los fungicidas sobre el electrodo compuesto de grafito-teflón, se ha llevado a cabo la determinación de uno de ellos, tiram, en fresas contaminadas, empleando el procedimiento descrito en el apartado II.2.3.5.

En primer lugar, se aplicó dicho procedimiento a una muestra de fresas sin contaminar. El voltamperograma de barrido lineal obtenido para esta muestra blanco se presenta en la Figura 96. Como puede observarse, no apareció ningún pico de oxidación en el intervalo de potenciales barrido, lo que pone de manifiesto la no existencia de interferencias por parte de los componentes naturales de la muestra de fresas. En dicha figura aparecen también los voltamperogramas obtenidos para una muestra contaminada con $2 \mu\text{g g}^{-1}$ de tiram. Tras la aplicación del procedimiento descrito, la concentración final de tiram en la disolución analítica fue 1.2 mg L^{-1} . Para la determinación de la concentración de tiram se utilizó el método de adiciones estándar (Figura 96).

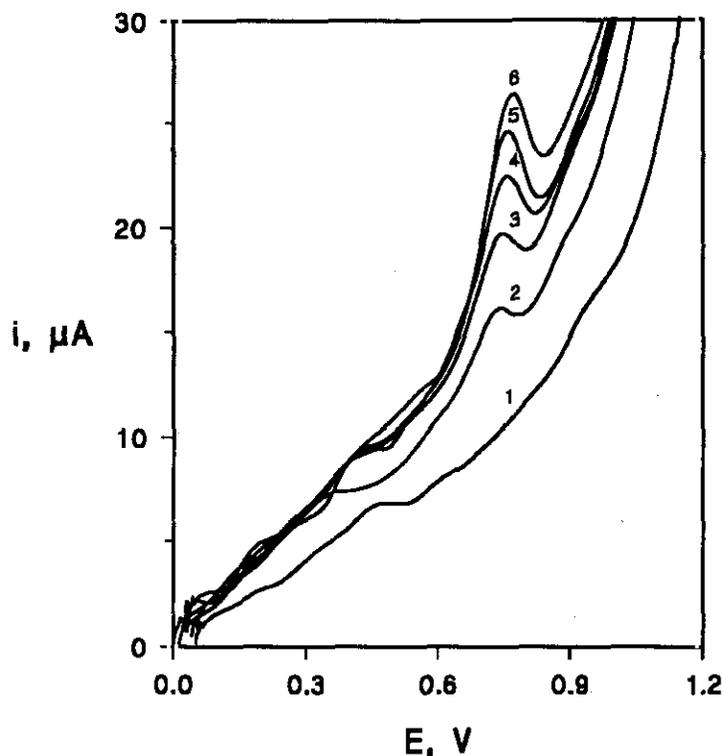


Figura 96

Voltamperogramas de barrido lineal sobre un electrodo de grafito-40% teflón para una muestra de fresas. (1) Disolución blanco (en ausencia de tiram); (2) muestra contaminada con 2 μg de tiram por gramo de fresa; (3-6) adiciones sucesivas de tiram; $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0.1 mol L^{-1} , pH 7.4; $t_{\text{ac}} = 300$ s; $E_{\text{ac}} = 0.0$ V; $v = 50$ mV s^{-1} .

En la Tabla LV se recogen los resultados obtenidos para cinco determinaciones. La concentración experimental media obtenida fue 1.17 ± 0.02 mg L^{-1} , que implica una recuperación media del 97 ± 1 % (1.95 ± 0.03 $\mu\text{g g}^{-1}$) para un nivel de significación de 0.05. Estos resultados demuestran claramente la validez del método desarrollado para la determinación de tiram en muestras de este tipo.

Tabla LV

Recuperación de tiram en muestras de fresas contaminadas empleando LSV sobre un electrodo de grafito-40% teflón; $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ 0.1 mol L⁻¹, pH 7.4; t_{ac} = 300 s; E_{ac} = 0.0 V; v = 50 mV s⁻¹.

Muestra	C _{teórica} Tiram, mg L ⁻¹	C _{encontrada} Tiram, mg L ⁻¹	Recuperación, %
1	1.20	1.18	98.5
2	1.20	1.15	96.0
3	1.20	1.17	95.7
4	1.20	1.18	98.5
5	1.20	1.17	95.7

III.5.- ELECTRODOS DE GRAFITO-TEFLON COMO DETECTORES ELECTROQUIMICOS EN SISTEMAS EN FLUJO

Un aspecto particularmente interesante, desde el punto de vista práctico, de los electrodos compósitos de grafito-teflón es la posibilidad de ser utilizados como electrodos indicadores en sistemas en flujo, dado que sus propiedades mecánicas y químicas permiten esperar, en principio, una buena estabilidad de estos electrodos en dichos sistemas en flujo, siendo compatibles con disolventes no acuosos y mostrando procedimientos muy sencillos de regeneración de la superficie electródica en caso de ser necesario. Es importante recordar, en este punto, la dificultad de utilizar como detectores en continuo los electrodos de pasta de carbono modificados desarrollados en esta Memoria, principalmente como consecuencia del hinchamiento de la pasta que provoca grandes variaciones en la línea base (Apartado III.2).

En este capítulo se exponen los resultados obtenidos cuando se emplean los electrodos compósitos de grafito-teflón como electrodos indicadores amperométricos en sistemas en continuo. En primer lugar, se ha desarrollado un método para la determinación de tiram y disulfiram mediante análisis por inyección en flujo, habiéndose investigado la posibilidad de preconcentrar estos fungicidas en continuo sobre la superficie del electrodo. Además, se ha puesto a punto un procedimiento de separación en continuo de tiram y disulfiram acoplando una pequeña columna de separación al sistema FIA. En segundo lugar, se ha desarrollado un método cromatográfico para la determinación conjunta de ambos fungicidas, con objeto de demostrar la aplicabilidad de los electrodos compósitos de grafito-teflón como detectores en HPLC con eluyentes de alto contenido en disolventes orgánicos.

III.5.1.- DETERMINACION DE TIRAM Y DISULFIRAM MEDIANTE INYECCION EN FLUJO CON DETECCION AMPEROMETRICA

El comportamiento de los electrodos compósitos de grafito-40% teflón como detectores amperométricos en sistemas en flujo se ha investigado, en primer lugar, empleando un sistema de inyección en flujo simple (Apartado II.3.1.1). La determinación de tiram y disulfiram, tras la optimización sistemática de las variables experimentales, se ha llevado a cabo basándose en sus procesos de oxidación electroquímica comentados en el capítulo III.4.

III.5.1.1.- Elección del potencial aplicado

La elección del potencial aplicado al electrodo compósito, para su empleo como detector amperométrico, se ha llevado a cabo a partir de la representación de las intensidades de pico medidas a diferentes valores del potencial aplicado en el intervalo +0.20 - +1.10 V. En la Figura 97 se muestran los resultados obtenidos para tiram y disulfiram cuando se inyectan 250 μL de una disolución del fungicida $5.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ en el caudal de la disolución portadora, constituida por regulador fosfato 0.1 mol L^{-1} de pH 7.4. En esta representación también aparecen los valores de la corriente de fondo para cada uno de los potenciales aplicados.

Como puede observarse, para ambos fungicidas se obtiene una meseta de intensidades bien definida a valores de potencial comprendidos entre +0.90 y +1.05 V, habiéndose escogido en ambos casos, para estudios posteriores, un valor del potencial aplicado al electrodo de +1.0 V.

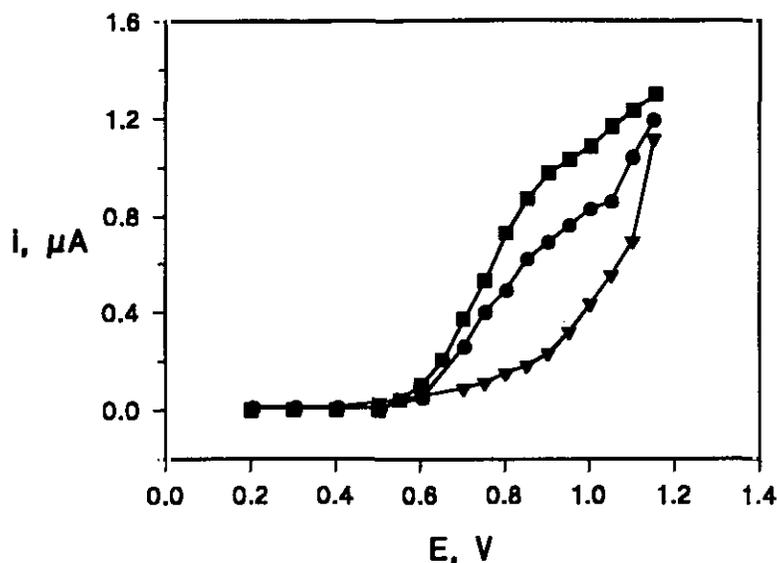


Figura 97

Influencia del potencial aplicado sobre la intensidad de pico de: (■) tiram 5.0×10^{-6} mol L^{-1} , (●) disulfiram 5.0×10^{-6} mol L^{-1} , (▼) corriente de fondo, mediante análisis por inyección en flujo empleando como electrodo indicador un electrodo compuesto de grafito-40% teflón. $\text{H}_2\text{PO}_4/\text{HPO}_4^{2-}$ 0.1 mol L^{-1} , pH 7.4; caudal: 1.9 mL min^{-1} ; $V_{\text{iny}} = 250$ μL .

III.5.1.2.- Repetibilidad de las señales obtenidas

Dada la capacidad de adsorción de los fungicidas sobre la superficie del electrodo compuesto que se ha observado en discontinuo bajo condiciones de agitación constante (Apartado III.4.2), parecía posible esperar un ensuciamiento de la superficie del electrodo al efectuar inyecciones sucesivas de tiram o disulfiram en el sistema en continuo.

Sin embargo, en las condiciones experimentales utilizadas, no se requirió ningún pretratamiento o procedimiento de limpieza del electrodo indicador después de cada inyección para obtener una buena repetibilidad de las señales y una corriente

de fondo estable. Basta con pulir diariamente la superficie del electrodo brevemente (unos pocos segundos) sobre papel de SiC para lijar madera, para obtener una superficie electródica nueva que no se ensucia de forma apreciable durante toda la jornada de trabajo. A modo de ejemplo, en la Figura 98 se muestran las señales obtenidas para 21 inyecciones sucesivas de una disolución de tiram $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. El valor de la desviación estándar relativa obtenido para las medidas de la intensidad de pico fue de 2.7%.

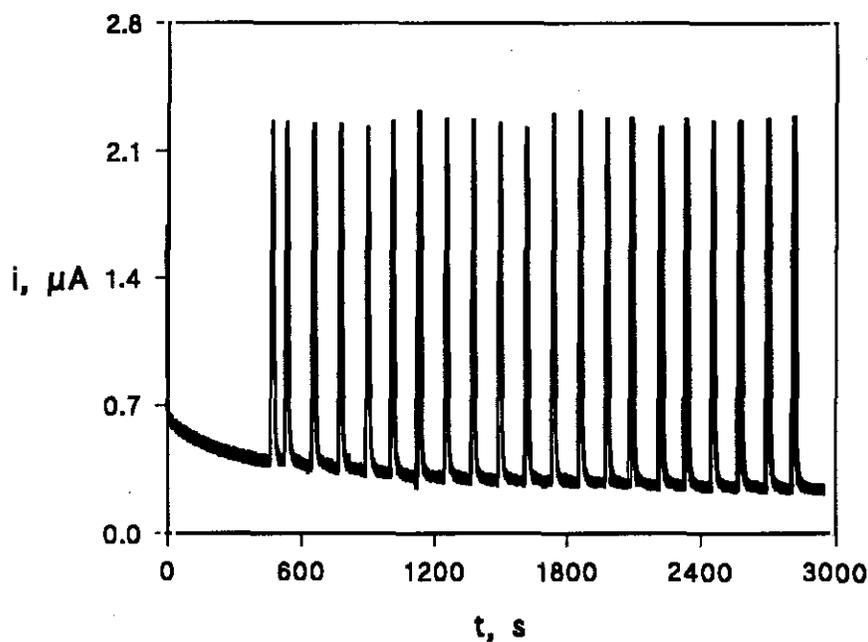


Figura 98

Diagramas obtenidos para inyecciones sucesivas de tiram $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ en medio regulador fosfato 0.1 mol L^{-1} de pH 7.4. Caudal: 1.9 mL min^{-1} ; $V_{\text{iny}} = 250 \text{ μL}$; $E = +1.0 \text{ V}$.

Esta facilidad de regeneración de la superficie del electrodo es un aspecto muy importante desde un punto de vista práctico. De hecho, un electrodo compuesto de grafito-teflón puede ser utilizado, en las condiciones experimentales mencionadas anteriormente, durante varios días sin que se observe ningún deterioro de las señales medidas. Esto constituye una gran ventaja con respecto a los electrodos convencionales como puede ser el de carbono vitrificado, o con respecto a los electrodos modificados de pasta de carbono comentados en el capítulo III.2.

III.5.1.3.- Optimización de las variables hidrodinámicas

Se ha estudiado la influencia de las distintas variables hidrodinámicas, como son el caudal de la disolución portadora y el volumen de inyección, sobre las señales amperométricas FIA de tiram y disulfiram.

Al aumentar el caudal de la disolución portadora (regulador fosfato 0.1 mol L⁻¹ de pH 7.4) entre 0.23 y 2.2 mL min⁻¹ se observa, como era de esperar, para ambos fungicidas, un aumento en la altura de pico y una disminución en la anchura de pico y en el tiempo de residencia (Tablas LVI, LVII y Figuras 99-104). Estas variaciones son menos significativas para los caudales más altos, de forma que las señales son muy similares a partir de un caudal de 1.7 mL min⁻¹.

Por consiguiente, se ha escogido un valor de 1.9 mL min⁻¹ para experimentos posteriores, con el fin de mejorar la sensibilidad de las medidas.

Tabla LVI

Influencia del caudal de la disolución portadora sobre la intensidad, i_p , el tiempo de residencia, T, y la anchura, Δt , de la señal obtenida mediante inyección en flujo con detección amperométrica empleando un electrodo compuesto de grafito-40% teflón. Tiram 5.0×10^{-6} mol L^{-1} en medio $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ 0.1 mol L^{-1} , pH 7.4. Volumen de inyección: 250 μL . $E = +1.0$ V.

Caudal, mL min^{-1}	i_p , μA	T, s	Δt , s
0.23	0.29	52	83
0.43	0.47	31	48
0.64	0.60	21	33
0.87	0.69	17	23
1.11	0.77	13	19
1.32	0.91	11	16
1.50	1.01	9	15
1.71	1.08	7	14
1.92	1.10	6	11
2.14	1.17	6	10

Tabla LVII

Influencia del caudal de la disolución portadora sobre la intensidad, i_p , el tiempo de residencia, T , y la anchura, Δt , de la señal obtenida mediante inyección en flujo con detección amperométrica empleando un electrodo compuesto de grafito-40% teflón. Disulfiram 5.0×10^{-6} mol L^{-1} en medio $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ 0.1 mol L^{-1} , pH 7.4. Volumen de inyección: 250 μL . $E = +1.0$ V.

Caudal, mL min^{-1}	i_p , μA	T, s	Δt , s
0.38	0.40	30	45
0.58	0.55	23	28
0.78	0.60	17	23
1.00	0.70	14	19
1.22	0.72	12	15
1.45	0.78	10	13
1.64	0.86	8	11
1.89	0.84	7	8
2.00	0.86	7	8
2.20	0.83	6	8

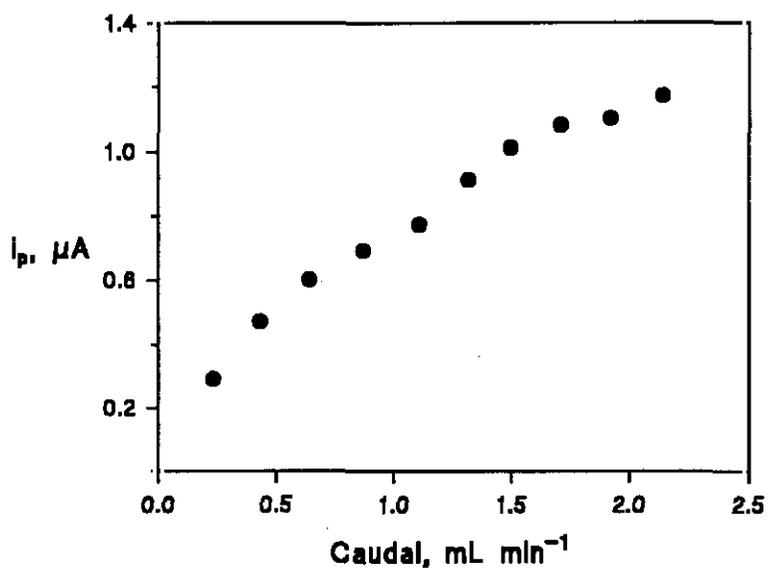


Figura 99

Influencia del caudal de la disolución portadora sobre la intensidad de pico, i_p , de tiram $5.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ en medio $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0.1 mol L^{-1} de pH 7.4, mediante análisis por inyección en flujo empleando como electrodo indicador un electrodo compuesto de grafito-40% teflón. $V_{\text{iny}} = 250 \text{ μL}$; $E = +1.0 \text{ V}$.

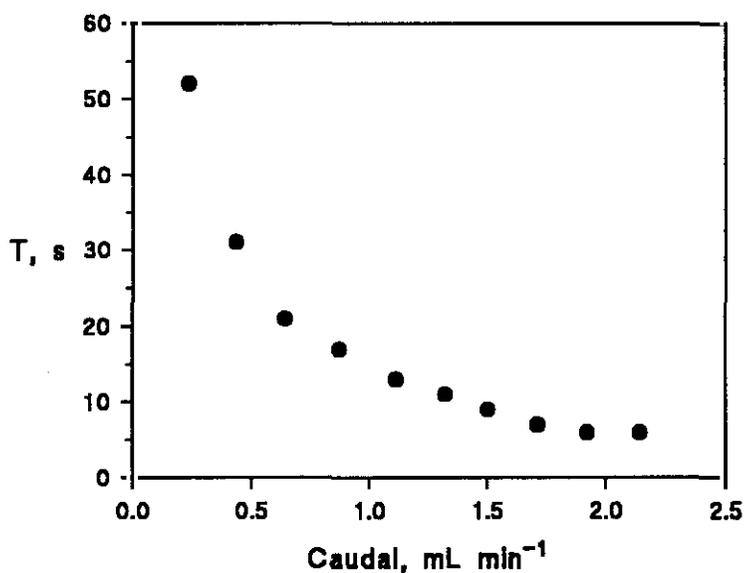


Figura 100

Influencia del caudal de la disolución portadora sobre el tiempo de residencia, T , de tiram $5.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ en medio $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0.1 mol L^{-1} de pH 7.4, mediante análisis por inyección en flujo empleando como electrodo indicador un electrodo compuesto de grafito-40% teflón. $V_{\text{iny}} = 250 \text{ μL}$; $E = +1.0 \text{ V}$.

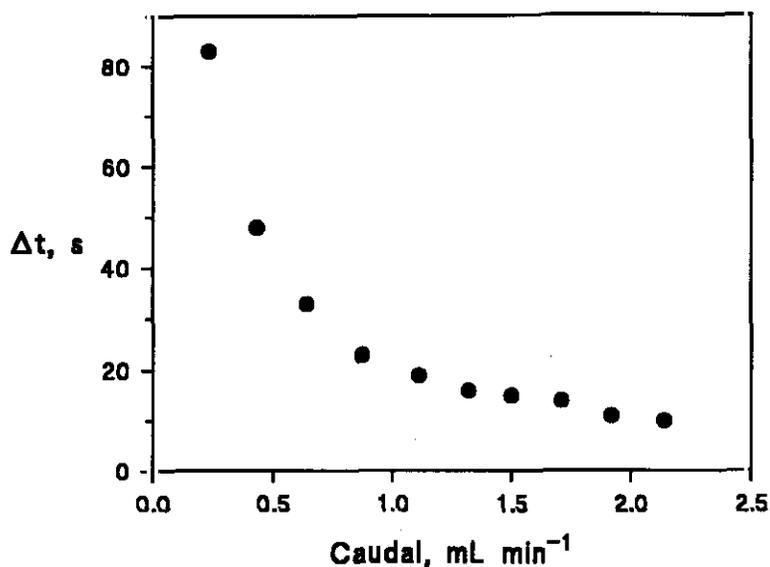


Figura 101

Influencia del caudal de la disolución portadora sobre la anchura de pico, Δt , de tiram 5.0×10^{-6} mol L⁻¹ en medio H₂PO₄/HPO₄²⁻ 0.1 mol L⁻¹ de pH 7.4, mediante análisis por inyección en flujo empleando como electrodo indicador un electrodo compuesto de grafito-40% teflón. $V_{\text{iny}} = 250 \mu\text{L}$; $E = +1.0$ V.

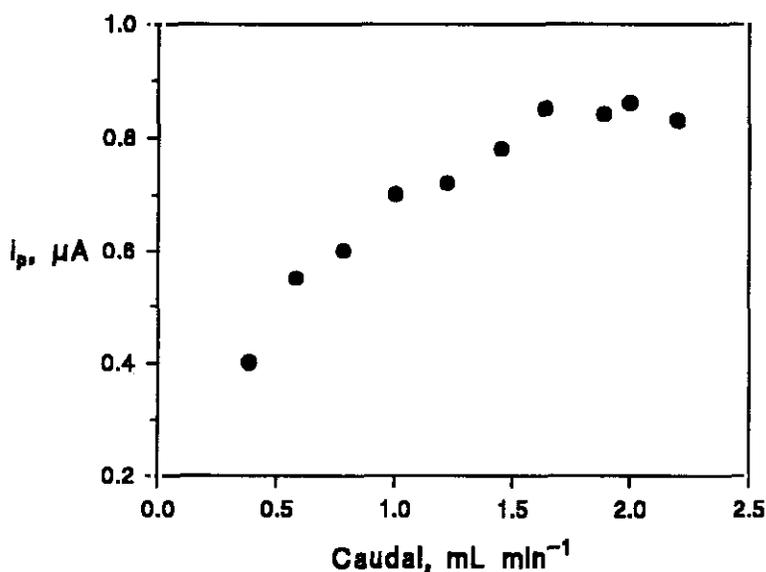


Figura 102

Influencia del caudal de la disolución portadora sobre la intensidad de pico, i_p , de disulfiram 5.0×10^{-6} mol L⁻¹ en medio H₂PO₄/HPO₄²⁻ 0.1 mol L⁻¹ de pH 7.4, mediante análisis por inyección en flujo empleando como electrodo indicador un electrodo compuesto de grafito-40% teflón. $V_{\text{iny}} = 250 \mu\text{L}$; $E = +1.0$ V.

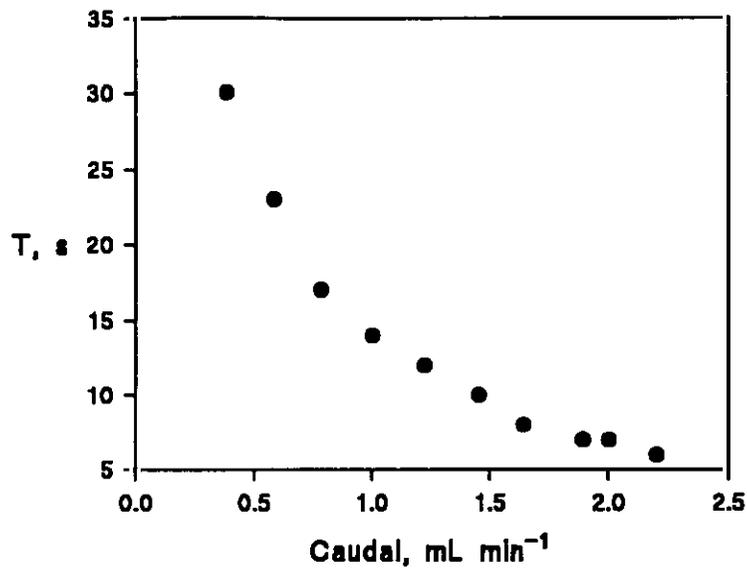


Figura 103

Influencia del caudal de la disolución portadora sobre el tiempo de residencia, T , de disulfiram $5.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ en medio $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0.1 mol L^{-1} de pH 7.4, mediante análisis por inyección en flujo empleando como electrodo indicador un electrodo compuesto de grafito-40% teflón. $V_{\text{iny}} = 250 \text{ } \mu\text{L}$; $E = +1.0 \text{ V}$.

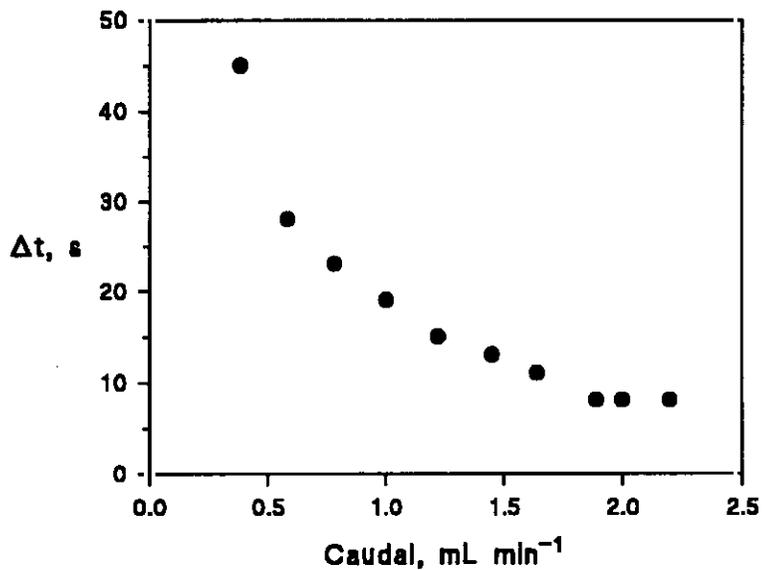


Figura 104

Influencia del caudal de la disolución portadora sobre la anchura de pico, Δt , de disulfiram $5.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ en medio $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0.1 mol L^{-1} de pH 7.4, mediante análisis por inyección en flujo empleando como electrodo indicador un electrodo compuesto de grafito-40% teflón. $V_{\text{iny}} = 250 \text{ } \mu\text{L}$; $E = +1.0 \text{ V}$.

La influencia del volumen de inyección se ha ensayado utilizando bucles de 150, 250, 350, 650 y 1150 μL . Los resultados obtenidos se muestran en las Tablas LVIII y LIX. A modo de ejemplo, en la Figura 105 se han representado los diagramas obtenidos cuando se inyectan volúmenes diferentes de una disolución patrón de tiram $5.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Al aumentar el volumen de muestra inyectado, aumenta la intensidad de pico pero también la anchura y el tiempo de residencia. Como compromiso entre una buena sensibilidad y una elevada capacidad de muestreo, se ha escogido un volumen de inyección de 250 μL tanto para el tiram como para el disulfiram. En estas condiciones experimentales y utilizando un tubo de teflón de 90 cm x 0.3 mm de diámetro interno, se pueden analizar 15 muestras por hora realizando las inyecciones por triplicado.

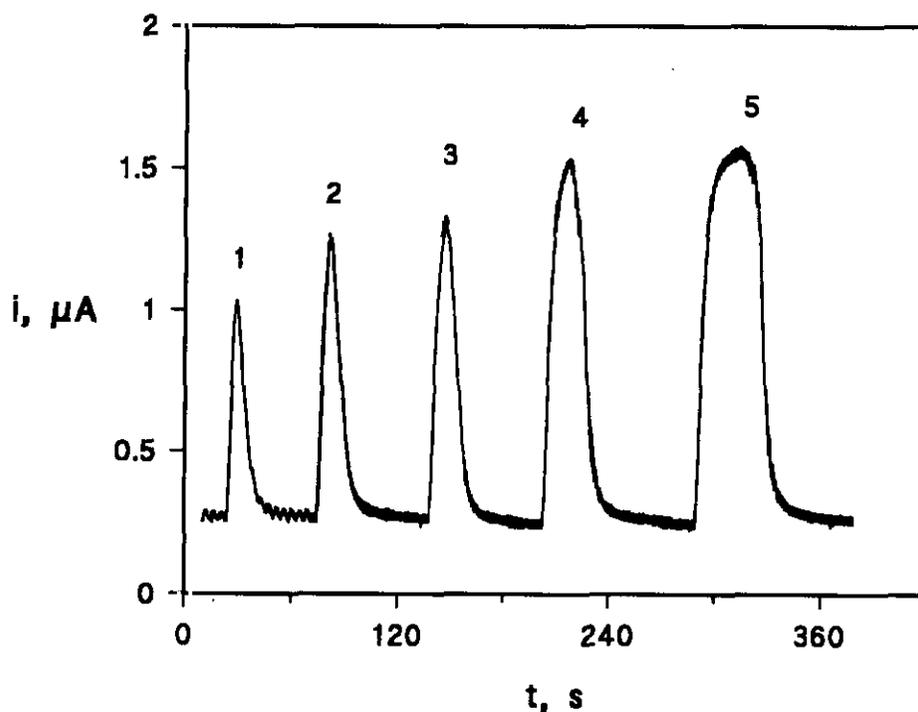


Figura 105

Influencia del volumen de inyección sobre las señales obtenidas para tiram $5.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ en medio $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0.1 mol L^{-1} de pH 7.4, empleando como electrodo indicador un electrodo compuesto de grafito-teflón. (1) 150 μL ; (2) 250 μL ; (3) 350 μL ; (4) 650 μL ; (5) 1150 μL . Caudal: 1.9 mL min^{-1} ; $E = +1.0 \text{ V}$.

Tabla LVIII

Influencia del volumen de inyección sobre la intensidad, i_p , el tiempo de residencia, T , y la anchura, Δt , de la señal obtenida mediante inyección en flujo con detección amperométrica empleando un electrodo compuesto de grafito-40% teflón. Tiram 5.0×10^{-6} mol L^{-1} en medio $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ 0.1 mol L^{-1} , pH 7.4. Caudal: 1.9 mL min^{-1} . $E = +1.0$ V.

V_{iny} , μL	i_p , μA	T , s	Δt , s
150	0.77	8	7
250	1.00	10	10
350	1.09	13	12
650	1.29	18	20
1150	1.31	28	36

Tabla LIX

Influencia del volumen de inyección sobre la intensidad, i_p , el tiempo de residencia, T , y la anchura, Δt , de la señal obtenida mediante inyección en flujo con detección amperométrica empleando un electrodo compuesto de grafito-40% teflón. Disulfiram 5.0×10^{-6} mol L^{-1} en medio $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ 0.1 mol L^{-1} , pH 7.4. Caudal: 1.9 mL min^{-1} . $E = +1.0$ V.

V_{iny} , μL	i_p , μA	T , s	Δt , s
150	0.70	9	7
250	0.79	11	10
350	0.80	15	13
650	0.95	21	23
1150	0.94	33	41

III.5.1.4.- Curvas de calibrado y características analíticas

En la Tabla LX se resumen las características analíticas de los calibrados obtenidos para tiram y disulfiram, los cuales se han representado gráficamente en las Figuras 106 a 111. A modo de ejemplo, en las Figuras 112 y 113 se muestran los diagramas obtenidos para los calibrados en el intervalo de concentraciones intermedio.

Tabla LX

Características analíticas de los calibrados obtenidos para la determinación de tiram y disulfiram mediante inyección en flujo con detección amperométrica empleando un electrodo compuesto de grafito-40% teflón. $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ 0.1 mol L⁻¹, pH 7.4; caudal: 1.9 mL min⁻¹; $V_{iny} = 250 \mu L$; $E = +1.0 V$.

TIRAM			
Intervalo lineal, mol L ⁻¹	1.0x10 ⁻⁷ -10.0x10 ⁻⁷	1.0x10 ⁻⁶ -10.0x10 ⁻⁶	1.0x10 ⁻⁵ -4.0x10 ⁻⁵
Coefficiente de correlación	0.998	0.9992	0.99995
Pendiente, $\mu A L mol^{-1}$	(1.9±0.1)x10 ⁵	(1.64±0.05)x10 ⁵	(1.24±0.04)x10 ⁵
Ordenada en el origen, μA	-0.001±0.006	0.08±0.03	0.3±0.1
L. determinación, mol L ⁻¹		1.4x10 ⁻⁷	
L. detección, mol L ⁻¹		4.3x10 ⁻⁸	
RSD, %		2.7 ^a 7.7 ^b	
DISULFIRAM			
Intervalo lineal, mol L ⁻¹	1.0x10 ⁻⁷ -10.0x10 ⁻⁷	1.0x10 ⁻⁶ -10.0x10 ⁻⁶	1.0x10 ⁻⁵ -4.0x10 ⁻⁵
Coefficiente de correlación	0.9995	0.9994	0.9990
Pendiente, $\mu A L mol^{-1}$	(1.24±0.03)x10 ⁵	(1.46±0.04)x10 ⁵	(1.3±0.2)x10 ⁵
Ordenada en el origen, μA	0.0016±0.002	0.09±0.03	0.6±0.58
L. determinación, mol L ⁻¹		6.7x10 ⁻⁸	
L. detección, mol L ⁻¹		2.0x10 ⁻⁸	
RSD, %		4.1 ^a 5.7 ^b	

^a Nivel de concentración 5.0x10⁻⁶ mol L⁻¹, ^b nivel de concentración 1.0x10⁻⁷ mol L⁻¹

La desviación de la linealidad se produce, en ambos casos, para concentraciones de fungicida mayores de $4.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, como consecuencia de la adsorción sobre la superficie del electrodo. Los valores de desviación estándar relativa se han calculado a partir de la medida de diez disoluciones diferentes de cada fungicida a dos niveles de concentración distintos, realizando siempre inyecciones por triplicado. Los límites de determinación y de detección que aparecen en la Tabla LX se han calculado según los criterios $10s$ y $3s_b/m$ definidos en el Apartado III.1.5 y utilizando la desviación estándar de las señales para $1.0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ de cada uno de los fungicidas como estimador de la desviación estándar del blanco. Los valores de los límites de determinación y de detección son muy parecidos a los obtenidos en los experimentos en discontinuo empleando un período de preconcentración de 300 segundos a 0.0 V.

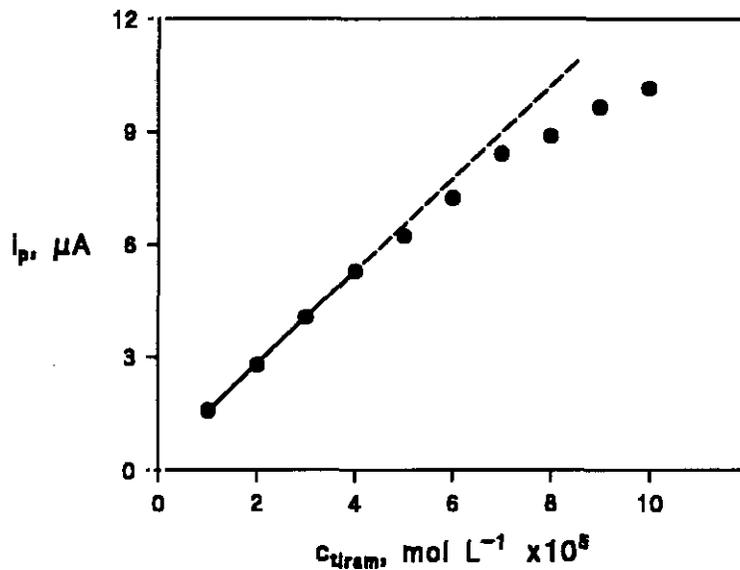


Figura 106

Influencia de la concentración de tiram sobre la intensidad de pico, i_p , mediante inyección en flujo con detección amperométrica empleando un electrodo de grafito-40% teflón. Intervalo de concentración: 1.0×10^{-5} a $10.0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0.1 mol L^{-1} , pH 7.4; caudal: 1.9 mL min^{-1} ; $V_{\text{iny}} = 250 \mu\text{L}$, $E = +1.0 \text{ V}$.

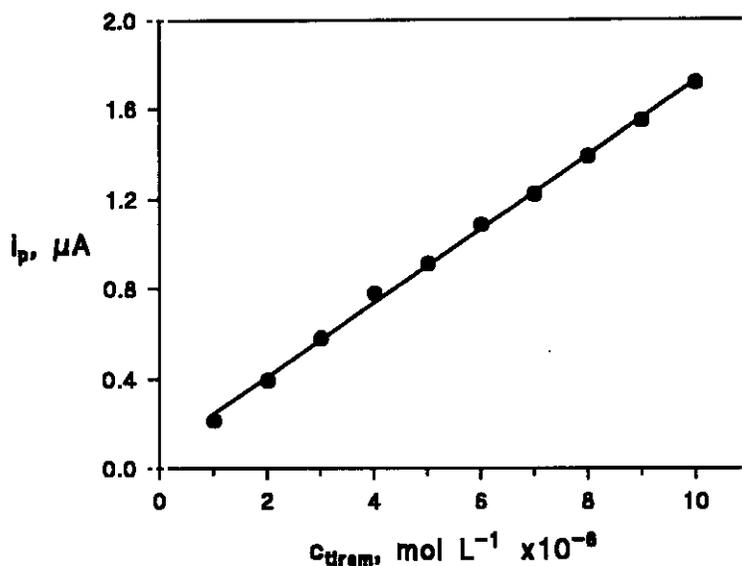


Figura 107

Influencia de la concentración de tiram sobre la intensidad de pico, i_p , mediante inyección en flujo con detección amperométrica empleando un electrodo de grafito-40% teflón. Intervalo de concentración: 1.0×10^{-6} a $10.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0.1 mol L^{-1} , pH 7.4; caudal: 1.9 mL min^{-1} ; $V_{\text{iny}} = 250 \mu\text{L}$, $E = +1.0 \text{ V}$.

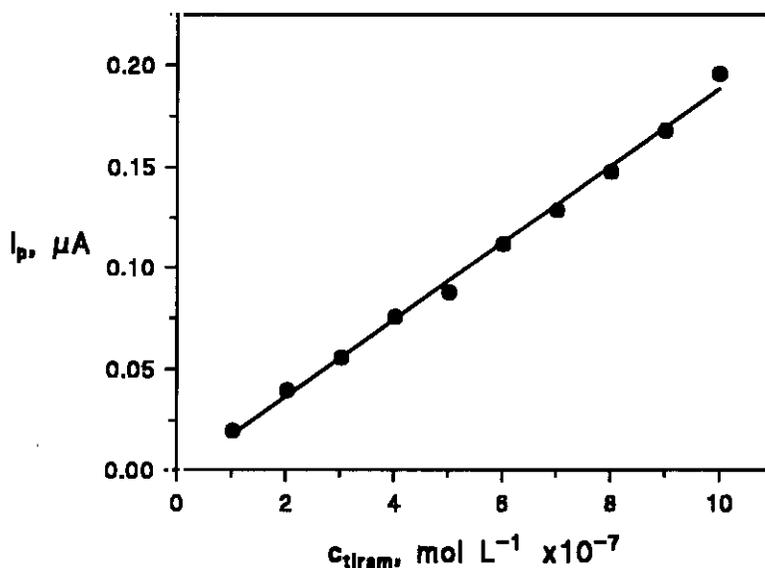


Figura 108

Influencia de la concentración de tiram sobre la intensidad de pico, i_p , mediante inyección en flujo con detección amperométrica empleando un electrodo de grafito-40% teflón. Intervalo de concentración: 1.0×10^{-7} a $10.0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$; $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0.1 mol L^{-1} , pH 7.4; caudal: 1.9 mL min^{-1} ; $V_{\text{iny}} = 250 \mu\text{L}$, $E = +1.0 \text{ V}$.

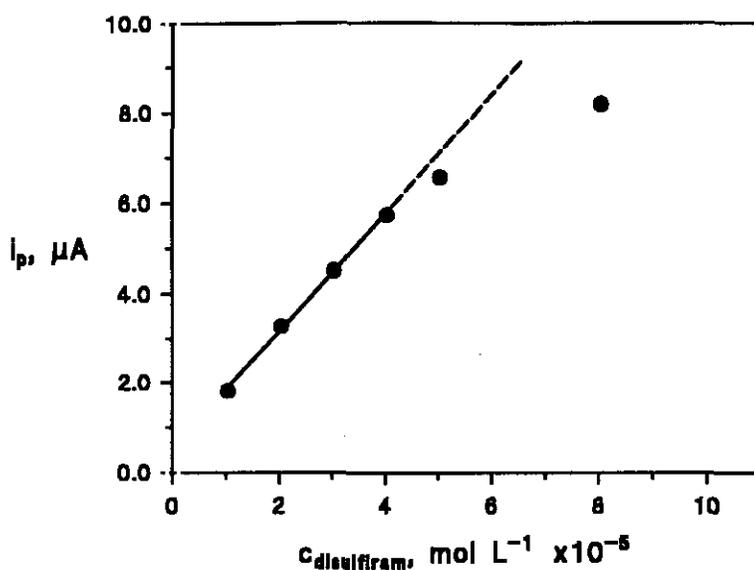


Figura 109

Influencia de la concentración de disulfiram sobre la intensidad de pico, i_p , mediante inyección en flujo con detección amperométrica empleando un electrodo de grafito-40% teflón. Intervalo de concentración: 1.0×10^{-5} a 10.0×10^{-5} mol L⁻¹; $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0.1 mol L⁻¹, pH 7.4; caudal: 1.9 mL min⁻¹; $V_{\text{iny}} = 250 \mu\text{L}$, $E = +1.0$ V.

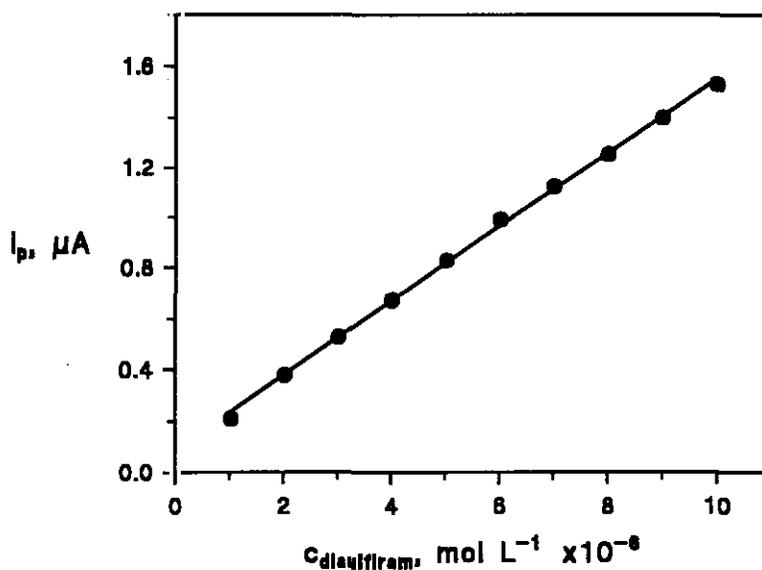


Figura 110

Influencia de la concentración de disulfiram sobre la intensidad de pico, i_p , mediante inyección en flujo con detección amperométrica empleando un electrodo de grafito-40% teflón. Intervalo de concentración: 1.0×10^{-6} a 10.0×10^{-6} mol L⁻¹; $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0.1 mol L⁻¹, pH 7.4; caudal: 1.9 mL min⁻¹; $V_{\text{iny}} = 250 \mu\text{L}$, $E = +1.0$ V.

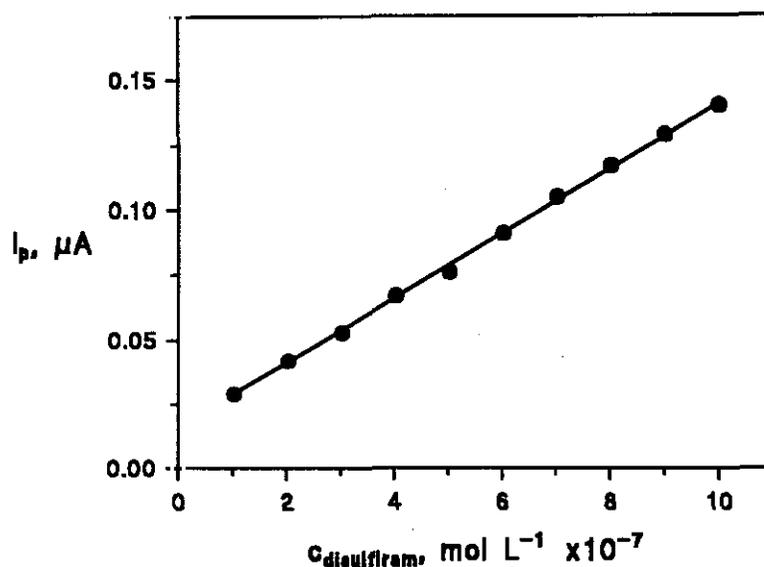


Figura 111

Influencia de la concentración de disulfiram sobre la intensidad de pico, i_p , mediante inyección en flujo con detección amperométrica empleando un electrodo de grafito-40% teflón. Intervalo de concentración: 1.0×10^{-7} a 10.0×10^{-7} mol L^{-1} ; $\text{H}_2\text{PO}_4/\text{HPO}_4^{2-}$ 0.1 mol L^{-1} , pH 7.4; caudal: 1.9 mL min^{-1} ; $V_{\text{iny}} = 250 \mu\text{L}$, $E = +1.0$ V.

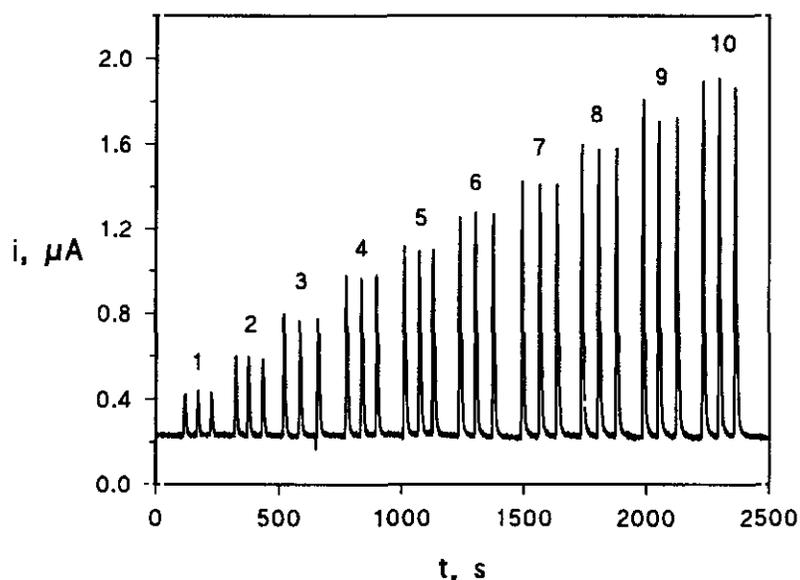


Figura 112

Diagrama obtenido por inyección de disoluciones (1) 1.0; (2) 2.0; (3) 3.0; (4) 4.0; (5) 5.0; (6) 6.0; (7) 7.0; (8) 8.0; (9) 9.0; (10) 10.0×10^{-6} mol L^{-1} de tiram en medio $\text{H}_2\text{PO}_4/\text{HPO}_4^{2-}$ 0.1 mol L^{-1} , pH 7.4, mediante inyección en flujo con detección amperométrica empleando un electrodo de grafito-40% teflón. Caudal: 1.9 mL min^{-1} ; $V_{\text{iny}} = 250 \mu\text{L}$, $E = +1.0$ V.

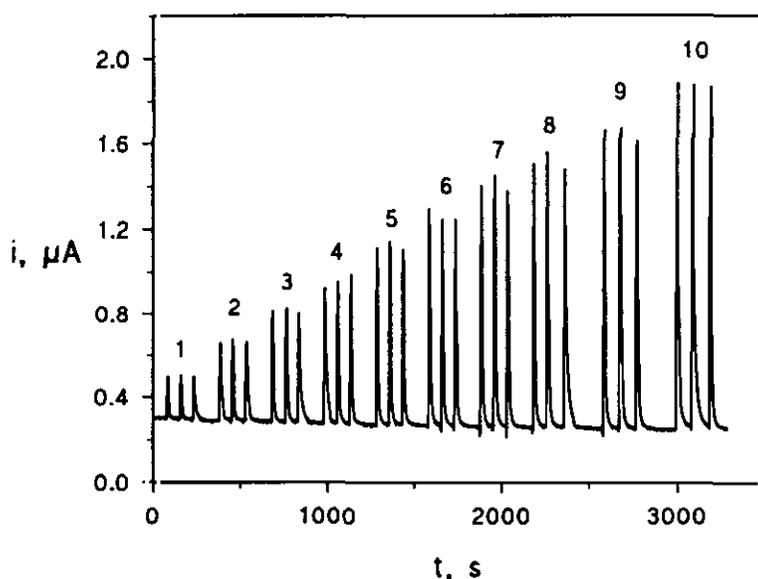


Figura 113

Figurama obtenido por inyección de disoluciones (1) 1.0; (2) 2.0; (3) 3.0; (4) 4.0; (5) 5.0; (6) 6.0; (7) 7.0; (8) 8.0; (9) 9.0; (10) $10.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de disulfiram en medio $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0.1 mol L^{-1} , pH 7.4, mediante inyección en flujo con detección amperométrica empleando un electrodo de grafito-40% teflón. Caudal: 1.9 mL min^{-1} ; $V_{\text{iny}} = 250 \mu\text{L}$, $E = +1.0 \text{ V}$.

III.5.1.1.- Estudio de interferencias

La señal amperométrica de tiram o disulfiram puede verse afectada por la presencia de ciertas sustancias que coexistan con el fungicida en la muestra. Así, se ha estudiado el grado de interferencia producida por el disulfiram sobre la señal de oxidación del tiram y viceversa, así como la influencia de ziram ($\text{N,N}'$ -dimetilditiocarbamato de zinc), fenol y Zn(II) sobre las señales de oxidación de ambos fungicidas.

En las condiciones experimentales utilizadas para la detección de tiram y disulfiram, tanto el ziram como el fenol dan lugar a señales de oxidación bien definidas en FIA cuando se inyectan a un nivel de concentración de $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (Figura 114), siendo la altura de pico para el ziram mayor que la del fenol. Por el contrario, como era de esperar, el Zn(II) no mostró ninguna respuesta al potencial aplicado.

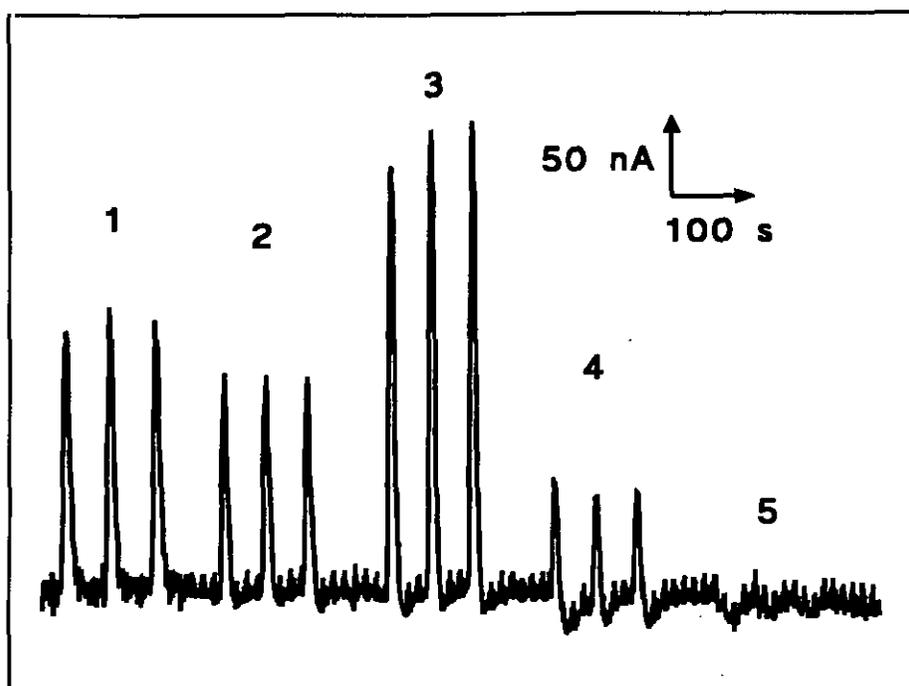


Figura 114

Diagramas obtenidos por inyección de 1.0×10^{-6} mol L^{-1} de: (1) tiram, (2) disulfiram, (3) ziram, (4) fenol y (5) Zn(II), empleando como electrodo indicador un electrodo compuesto de grafito-40% teflón. $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ 0.1 mol L^{-1} , pH 7.4, caudal: 1.9 mL min^{-1} ; $V_{iny} = 250 \mu L$, $E = +1.0$ V.

En las Tablas LXI y LXII se recogen los valores de la intensidad de pico obtenida a +1.0 V cuando se mezclan tiram o disulfiram a un nivel de concentración de 1.0×10^{-6} mol L^{-1} con concentraciones variables del compuesto interferente. A excepción del Zn(II), que no interfiere incluso cuando la relación Zn(II):fungicida es 50:1, todas las demás sustancias incrementan la señal de oxidación de tiram o disulfiram más de un 10% incluso cuando la relación interferente analito es menor de 1:1.

El problema originado por los compuestos interferentes en la determinación en continuo de tiram o disulfiram pone de manifiesto la necesidad de una separación cromatográfica previa cuando se trabaja con una mezcla de estos compuestos. El hecho de que las sustancias ensayadas interfieran en las medidas de inyección en

flujo del tiram o del disulfiram, puede transformarse en una importante ventaja para llevar a cabo la detección amperométrica de estos fungicidas tras dicha separación cromatográfica y así, como se verá en el capítulo III.5.2, la respuesta amperométrica observada para todos los compuestos orgánicos ensayados permitirá su detección electroquímica sobre los electrodos compósitos de grafito-teflón.

Tabla LXI

Influencia de la presencia de diversas sustancias sobre la intensidad de pico, i_p , obtenida mediante inyección en flujo, de tiram 1.0×10^{-6} mol L^{-1} en medio $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ 0.1 mol L^{-1} , pH 7.4, empleando como electrodo indicador un electrodo compuesto de grafito-40% teflón. Caudal: 1.9 mL min^{-1} ; $V_{iny} = 250$ μL , $E = +1.0$ V.

Relación interferente:tiram	i_p , μA			
	Sustancia interferente			
	Disulfiram	Ziram	Fenol	Zn(II)
0:1	0.32	0.31	0.30	0.30
0.2:1	0.34	0.33	0.30	-
0.4:1	0.34	0.34	0.30	-
0.6:1	0.37 (15)	0.37 (15)	0.29	-
0.8:1	0.41 (28)	0.41 (28)	0.30	-
1:1	0.46 (44)	0.46 (44)	0.33 (10)	0.29
2:1	-	-	0.37 (23)	0.29
10:1	-	-	-	0.30
50:1	-	-	-	0.29

En esta Tabla, los valores entre paréntesis representan el error relativo, en %, de la medida de la intensidad de pico de tiram.

Tabla LXII

Influencia de la presencia de diversas sustancias sobre la intensidad de pico, i_p , obtenida mediante inyección en flujo, de disulfiram 1.0×10^{-6} mol L^{-1} en medio $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ 0.1 mol L^{-1} , pH 7.4, empleando como electrodo indicador un electrodo compuesto de grafito-40% teflón. Caudal: 1.9 mL min^{-1} ; $V_{inj} = 250 \mu L$, $E = +1.0 V$.

Relación interferente:disulfiram	i_p , μA			
	Sustancia interferente			
	Tiram	Ziram	Fenol	Zn(II)
0:1	0.23	0.23	0.22	0.22
0.2:1	0.24	0.27 (17)	0.21	-
0.4:1	0.25	0.29 (26)	0.27 (22)	-
0.6:1	0.29 (26)	0.30 (30)	0.28 (27)	-
0.8:1	0.33 (43)	0.37 (61)	0.30 (36)	-
1:1	0.37 (61)	0.41 (78)	0.32 (45)	0.21
2:1	-	-	-	0.23
10:1	-	-	-	0.23
50:1	-	-	-	0.21

En esta Tabla, los valores entre paréntesis representan el error relativo, en %, de la medida de la intensidad de pico de tiram.

III.5.1.6.- Determinación de tiram en agua de grifo y agua de pozo

La metodología desarrollada se ha aplicado mediante inyección en flujo a la determinación de tiram en aguas de grifo y de pozo contaminadas con $40 \mu\text{g L}^{-1}$ de fungicida. El procedimiento experimental utilizado se ha detallado en el Apartado II.3.3.5. La propia disolución portadora se ha empleado para redissolver el residuo del extracto de fungicida llevado a sequedad, por lo que, en este caso, está constituida por regulador fosfato 0.1 mol L^{-1} de pH 7.4 y un 2% (v/v) de metanol que permite llevar a cabo dicha disolución. Siguiendo el procedimiento mencionado, la concentración final de tiram en la disolución analítica es de 2.0 mg L^{-1} .

A partir de adiciones de alícuotas de la disolución patrón de tiram a blancos de ambos tipos de aguas, sometidos al mismo tratamiento descrito para las muestras, se han construido curvas de calibrado en el intervalo de 10 a $80 \mu\text{g L}^{-1}$. Para el agua de grifo, se obtuvo un coeficiente de correlación de 0.9990, siendo los valores de la pendiente y de la ordenada en el origen de $0.43 \pm 0.04 \mu\text{A L } \mu\text{g}^{-1}$ (lo que corresponde a $(1.04 \pm 0.09) \times 10^5 \mu\text{A L mol}^{-1}$) y $-0.02 \pm 0.09 \mu\text{A}$, respectivamente. En el caso del agua de pozo, el coeficiente de correlación fue 0.994 y los valores de la pendiente y la ordenada en el origen fueron $0.5 \pm 0.1 \mu\text{A L } \mu\text{g}^{-1}$ [$(1.3 \pm 0.2) \times 10^5 \mu\text{A L mol}^{-1}$] y $-0.1 \pm 0.3 \mu\text{A}$, respectivamente.

La determinación de tiram en la muestra contaminada se ha llevado a cabo por interpolación en el calibrado mencionado anteriormente correspondiente. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla LXIII. Para cada muestra se han realizado cinco determinaciones, obteniéndose una recuperación media de $103 \pm 6 \%$ ($41 \pm 3 \mu\text{g L}^{-1}$ de tiram) en el agua de grifo y de $97 \pm 7 \%$ ($39 \pm 3 \mu\text{g L}^{-1}$ de tiram) en el agua de pozo, estando los intervalos de confianza calculados para un nivel de significación de 0.05. Estos valores de recuperación próximos al 100% indican que el método desarrollado es apropiado para la determinación de tiram en este tipo de aguas.

Tabla LXIII

Determinación de tiram en muestras de aguas contaminadas con 40 $\mu\text{g L}^{-1}$ de tiram mediante inyección en flujo con detección amperométrica, empleando como electrodo indicador un electrodo de grafito-40% teflón. $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0.1 mol L^{-1} , pH 7.4, 2% metanol v/v; caudal: 1.9 mL min^{-1} ; $V_{\text{iny}} = 250 \mu\text{L}$, $E = +1.0 \text{ V}$.

AGUA DE GRIFO				
Muestra	$C_{\text{teórica}}$ Tiram, $\mu\text{g L}^{-1}$	$C_{\text{encontrada}}$ Tiram, mg L^{-1}	Recuperación, %	
1	40	43	107	
2	40	38	95	
3	40	41	102	
4	40	42	105	
5	40	43	107	
AGUA DE POZO				
Muestra	$C_{\text{teórica}}$ Tiram, $\mu\text{g L}^{-1}$	$C_{\text{encontrada}}$ Tiram, mg L^{-1}	Recuperación, %	
1	40	41	102	
2	40	41	102	
3	40	36	90	
4	40	37	92	
5	40	38	95	

III.5.1.7.- Preconcentración por adsorción en disoluciones en flujo de los fungicidas

Se ha investigado la posibilidad de aprovechar, en continuo, la capacidad que poseen tanto el tiram como el disulfiram de adsorberse sobre la superficie de los electrodos compósitos de grafito-teflón, la cual ha sido comentada y empleada con fines cuantitativos en discontinuo (capítulo III.4.2). Así, se ha intentado mejorar las características analíticas de la determinación en flujo de tiram y disulfiram, principalmente por lo que se refiere a la selectividad, adaptando a este problema la metodología propuesta por Wang y Freiha [200]. Esta metodología consta de tres etapas: 1) preconcentración del analito sobre la superficie del electrodo, haciendo circular por todo el sistema FIA una disolución del fungicida durante un período de tiempo determinado; 2) cuantificación mediante un barrido anódico lineal de potencial; 3) regeneración electroquímica de la superficie del electrodo, preparando el sistema para el siguiente experimento.

Durante la etapa de preconcentración, el electrodo compósito se mantuvo a un potencial de 0.0 V, que es el potencial utilizado para llevar a cabo la acumulación en discontinuo (Apartado III.4.2).

III.5.1.7.1.- Repetibilidad de los voltamperogramas

En la Figura 115 (a) se muestra el voltamperograma obtenido cuando se barre linealmente el potencial entre +0.5 y +1.2 V a 50 mV s^{-1} , después de hacer pasar por la célula de flujo una disolución de tiram $5.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ en regulador fosfato 0.1 mol L^{-1} de pH 7.4 durante 3 minutos. Después de cada medida, la superficie del electrodo de grafito-teflón se limpió haciendo circular por la célula de flujo la disolución portadora de regulador fosfato y aplicando un potencial de -1.2 V durante 30 segundos (Apartado II.3.3.6). En la Figura 115, el voltamperograma (b) es el

correspondiente al fondo, obtenido cuando circula por el sistema la disolución reguladora de fosfato después de la regeneración electroquímica de la superficie del electrodo y el marcado como (c) es el voltamperograma obtenido para la misma disolución de tiram que en (a) cuando se ha repetido el procedimiento descrito por décima vez consecutiva. En la Figura 116 se muestran los voltamperogramas obtenidos para 10 medidas sucesivas de una disolución de disulfiram 5.0×10^{-6} mol L^{-1} empleando un tiempo de preconcentración de 5 minutos.

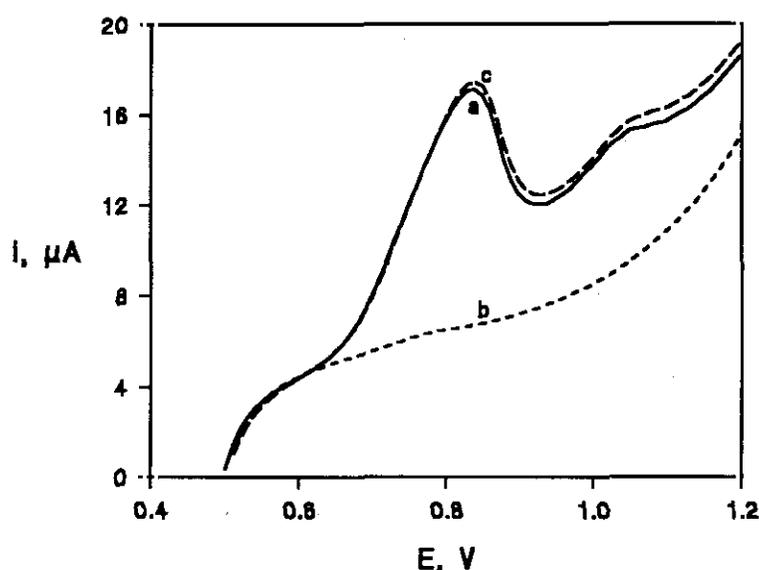


Figura 115

Voltamperogramas de barrido lineal registrados tras hacer circular por la célula de flujo una disolución de tiram 5.0×10^{-6} mol L^{-1} en medio $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ 0.1 mol L^{-1} , pH 7.4, durante 3 minutos: (a) primer barrido, (b) voltamperograma del fondo, (c) décimo barrido consecutivo. Caudal: 2.7 mL min^{-1} ; velocidad de barrido: 50 mV s^{-1} ; $E_{sc} = 0.0$ V.

Las corrientes de pico se midieron trazando la línea base de valle a valle. Los valores de la desviación estándar relativa obtenidos para las medidas de i_p fueron 1.1% y 1.5%, para tiram y disulfiram, respectivamente, lo que demuestra la buena repetibilidad del método desarrollado y, por tanto, la bondad de esta metodología para ser aplicada a la monitorización en continuo de estos fungicidas tras su preconcentración por adsorción.

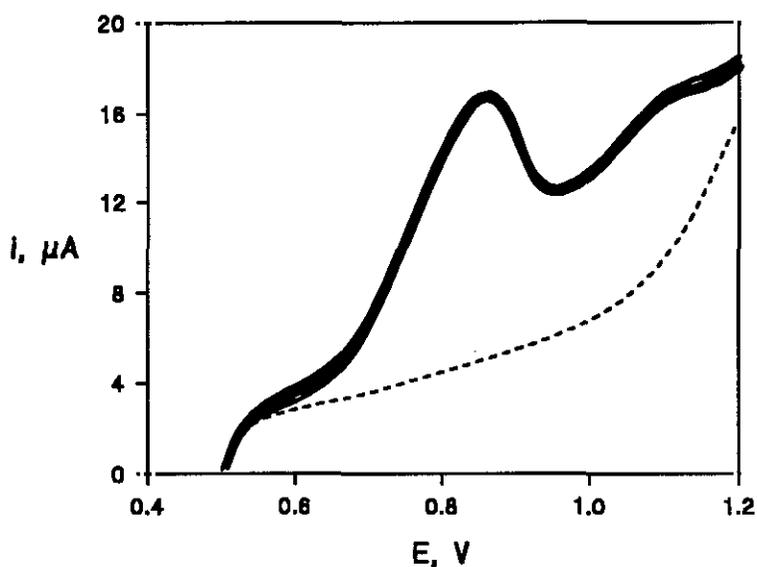


Figura 116

Voltamperogramas de barrido lineal registrados tras hacer circular por la célula de flujo, 10 veces consecutivas, una disolución de disulfiram 5.0×10^{-6} mol L⁻¹ en medio H₂PO₄⁻/HPO₄²⁻ 0.1 mol L⁻¹, pH 7.4, durante 5 minutos. Caudal: 2.7 mL min⁻¹; velocidad de barrido: 50 mV s⁻¹; E_{ac} = 0.0 V. (-----) Voltamperograma del fondo.

III.5.1.7.2.- Influencia del caudal

Se ha estudiado la influencia del caudal al que circula la disolución analítica sobre la intensidad de pico para disoluciones de fungicida 5.0×10^{-6} mol L⁻¹. Los resultados se recogen en las Tablas LXIV y LXV y se han representado en la Figura 117. A modo de ejemplo, en la Figura 118 se muestran los voltamperogramas obtenidos en el caso del disulfiram.

Se observa como, en ambos casos, la corriente de pico aumenta con el caudal entre 0.6 y 2.7 mL min⁻¹, permaneciendo prácticamente constante para valores superiores. En consecuencia, se escogió un caudal de 2.7 mL min⁻¹ para los experimentos subsiguientes.

Tabla LXIV

Influencia del caudal de la disolución analítica sobre la intensidad de pico obtenida, mediante LSV, tras la preconcentración por adsorción en continuo de tiram 5.0×10^{-6} mol L⁻¹ en medio H₂PO₄⁻/HPO₄²⁻ 0.1 mol L⁻¹, pH 7.4. Tiempo de paso de la disolución analítica por el sistema: 5 minutos; E_{ac} = 0.0 V; v = 50 mV s⁻¹.

Caudal, mL min ⁻¹	i _p , μA
0.6	3.26
1.0	4.15
1.5	4.75
1.9	5.06
2.2	5.32
2.7	5.54
3.0	5.37

Tabla LXV

Influencia del caudal de la disolución analítica sobre la intensidad de pico obtenida, mediante LSV, tras la preconcentración por adsorción en continuo de disulfiram 5.0×10^{-6} mol L⁻¹ en medio H₂PO₄⁻/HPO₄²⁻ 0.1 mol L⁻¹, pH 7.4. Tiempo de paso de la disolución analítica por el sistema: 5 minutos; E_{ac} = 0.0 V; v = 50 mV s⁻¹.

Caudal, mL min ⁻¹	i _p , μA
0.6	3.19
1.0	4.37
1.5	5.12
1.9	5.67
2.2	6.05
2.7	6.28
3.0	6.39

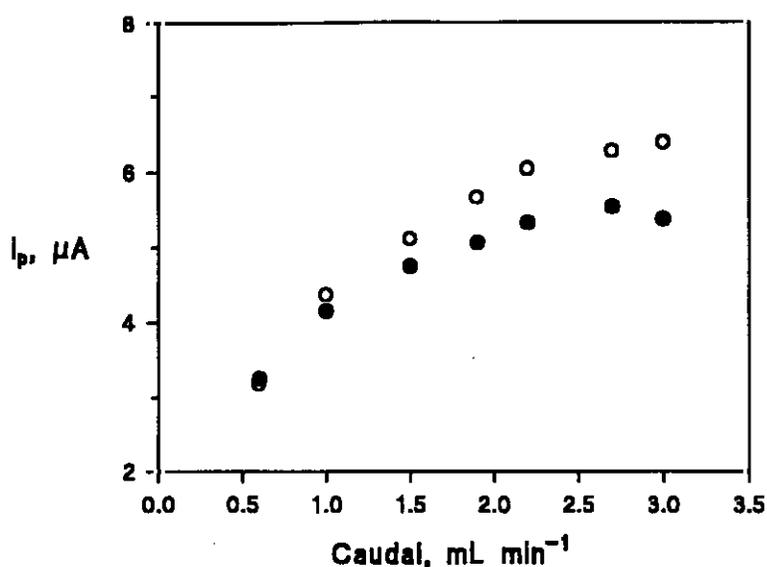


Figura 117

Influencia del caudal de la disolución analítica sobre la intensidad de pico obtenida, mediante LSV, tras la preconcentración por adsorción en continuo de 5.0×10^{-6} mol L⁻¹ (●) tiram y (○) disulfiram, en medio H₂PO₄/HPO₄²⁻ 0.1 mol L⁻¹ de pH 7.4; E_{sc} = +1.0 V; t_{sc} = 5 min; v = 50 mV s⁻¹.

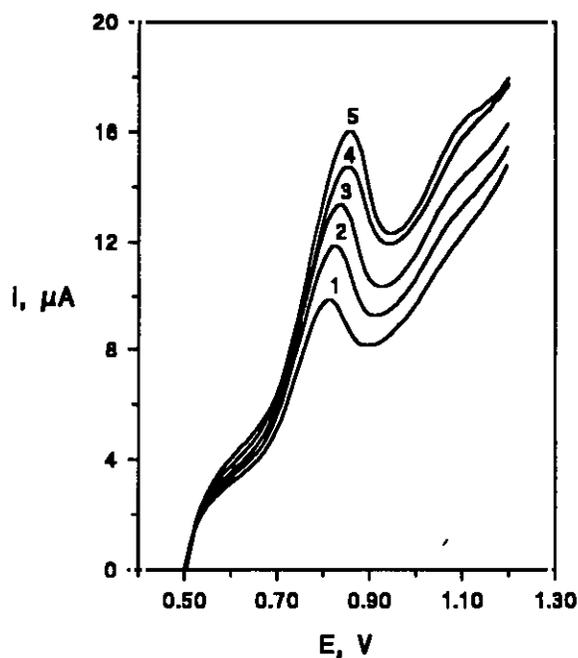


Figura 118

Influencia del caudal sobre los voltamperogramas obtenidos para disulfiram 5.0×10^{-6} mol L⁻¹, mediante LSV, tras la preconcentración por adsorción en continuo del fungicida, en medio H₂PO₄/HPO₄²⁻ 0.1 mol L⁻¹ de pH 7.4. Caudal: (1) 0.56, (2) 1.00, (3) 1.45, (4) 1.89, (5) 2.72 mL min⁻¹; E_{sc} = +1.0 V, t_{sc} = 5 min; velocidad de barrido: 50 mV s⁻¹.

III.5.1.7.3.- *Influencia del tiempo de paso de las disoluciones de los fungicidas*

La variación de la corriente de pico con el tiempo de preconcentración, es decir, con el tiempo de paso de la disolución de fungicida por el sistema FIA, se examinó para dos niveles de concentración diferentes: 5.0×10^{-6} y 5.0×10^{-7} mol L⁻¹. Los resultados se recogen en las Tablas LXVI y LXVII y se representan en la Figura 119.

Para una concentración 5.0×10^{-6} mol L⁻¹ de fungicida se observa un aumento de la intensidad de pico con el tiempo de acumulación, muy acusado para los períodos cortos, pero poco significativo para tiempos superiores a 5 minutos. Para el nivel de concentración más bajo, la corriente permanece prácticamente constante para períodos de acumulación superiores a 3 y 4 minutos, para tiram y disulfiram, respectivamente.

Tabla LXVI

Efecto del tiempo de acumulación sobre la intensidad de pico obtenida, mediante LSV, tras la preconcentración por adsorción en continuo de tiram en medio H₂PO₄⁻/HPO₄²⁻ 0.1 mol L⁻¹, pH 7.4; E_{ac} = 0.0 V; caudal: 2.7 mL min⁻¹; v = 50 mV s⁻¹.

Tiram 5.0×10^{-7} mol L ⁻¹	
t _{ac} , min	i _p , μA
1	-
2	0.71
3	0.99
4	0.90
5	0.92
6	-
8	-
10	1.07

Tiram 5.0×10^{-6} mol L ⁻¹	
t _{ac} , min	i _p , μA
1	1.69
2	3.07
3	3.93
4	4.40
5	5.02
6	5.29
8	5.62
10	6.20

Tabla LXVII

Efecto del tiempo de acumulación sobre la intensidad de pico obtenida, mediante LSV, tras la preconcentración por adsorción en continuo de disulfiram en medio $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ 0.1 mol L^{-1} , pH 7.4; $E_{ac} = 0.0$ V; caudal: 2.7 mL min^{-1} ; $v = 50$ mV s^{-1} .

Disulfiram 5.0×10^{-7} mol L^{-1}		Disulfiram 5.0×10^{-6} mol L^{-1}	
t_{ac} , min	i_p , μA	t_{ac} , min	i_p , μA
1	-	1	3.44
2	0.84	2	5.27
3	-	3	5.84
4	1.53	4	6.57
5	-	5	7.00
6	1.78	6	7.06
8	-	8	7.40
10	1.37	10	7.58

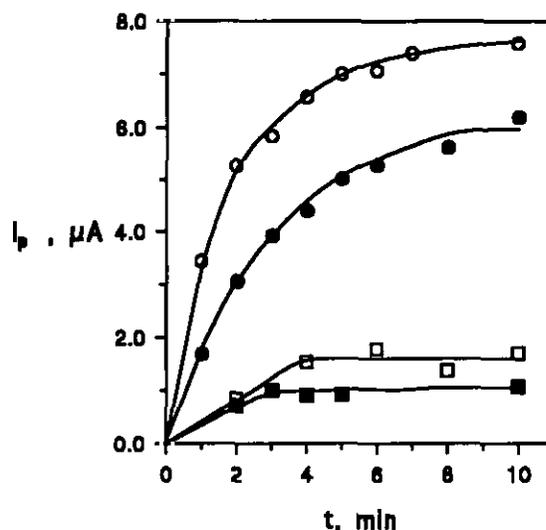


Figura 119

Influencia del tiempo de paso de la disolución analítica por el sistema (tiempo de acumulación) sobre la intensidad de pico obtenida, mediante LSV, tras la preconcentración por adsorción en continuo de (●) tiram 5.0×10^{-6} mol L^{-1} , (○) disulfiram 5.0×10^{-6} mol L^{-1} , (▲) tiram 5.0×10^{-7} mol L^{-1} , (□) disulfiram 5.0×10^{-7} mol L^{-1} . $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ 0.1 mol L^{-1} , pH 7.4; $E_{ac} = +1.0$ V; caudal: 2.7 mL min^{-1} ; $v = 50$ mV s^{-1} .

III.5.1.7.4.- Curvas de calibrado

En el caso del tiram, utilizando un período de acumulación de 3 minutos, se obtuvieron calibrados lineales en los intervalos de concentración 4.0×10^{-7} - 10.0×10^{-7} y 1.0×10^{-6} - 5.0×10^{-6} mol L⁻¹ (Tabla LXVIII y Figuras 120 y 121), observándose desviación de la linealidad para concentraciones superiores a 5.0×10^{-6} mol L⁻¹, como consecuencia de la saturación de la superficie electródica. Empleando períodos de acumulación mayores, no se obtuvieron relaciones intensidad-concentración lineales para el intervalo superior de concentraciones.

Por lo que respecta al disulfiram, se obtuvieron calibrados lineales en el intervalo 2.0×10^{-7} - 10.0×10^{-7} mol L⁻¹ empleando un tiempo de preconcentración de 4 minutos, y en el intervalo 3.0×10^{-6} - 8.0×10^{-6} mol L⁻¹ con un período de acumulación de 5 minutos (Tabla LXVIII y Figuras 122 y 123).

Tabla LXVIII

Curvas de calibrado para tiram y disulfiram, obtenidas mediante LSV, tras la preconcentración por adsorción en continuo de los fungicidas en medio H₂PO₄⁻/HPO₄²⁻ 0.1 mol L⁻¹, pH 7.4; E_{ac} = +1.0 V; caudal: 2.7 mL min⁻¹; v = 50 mV s⁻¹.

Fungicida	Tiempo de acumulación, min	Intervalo lineal, mol L ⁻¹	Coefficiente de correlación	Pendiente, $\mu\text{A L mol}^{-1} \times 10^6$	Ordenada en el origen, μA
Tiram	3	1.0×10^{-6} - 5.0×10^{-6}	0.999	1.13 ± 0.09	0.6 ± 0.3
	3	4.0×10^{-7} - 10.0×10^{-7}	0.998	1.8 ± 0.1	0.0 ± 0.1
Disulfiram	5	3.0×10^{-6} - 8.0×10^{-6}	0.999	1.12 ± 0.09	0.3 ± 0.5
	4	2.0×10^{-7} - 10.0×10^{-7}	0.999	2.3 ± 0.1	0.19 ± 0.07

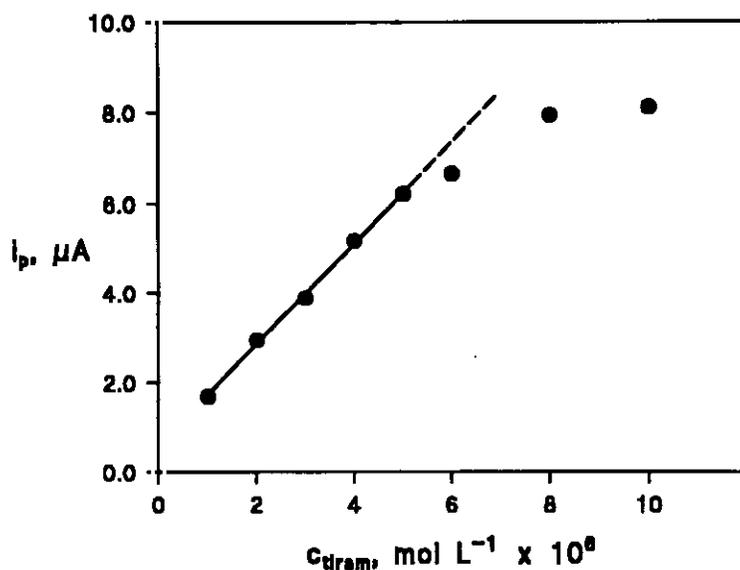


Figura 120

Influencia de la concentración de tiram sobre la intensidad de pico, i_p , mediante LSV, tras la preconcentración por adsorción en continuo del fungicida en medio $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0.1 mol L^{-1} , pH 7.4; Intervalo de concentración: de 1.0×10^{-6} a $10.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de tiram; tiempo de acumulación: 3 minutos; $E_{ac} = +1.0 \text{ V}$; caudal: 2.7 mL min^{-1} ; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

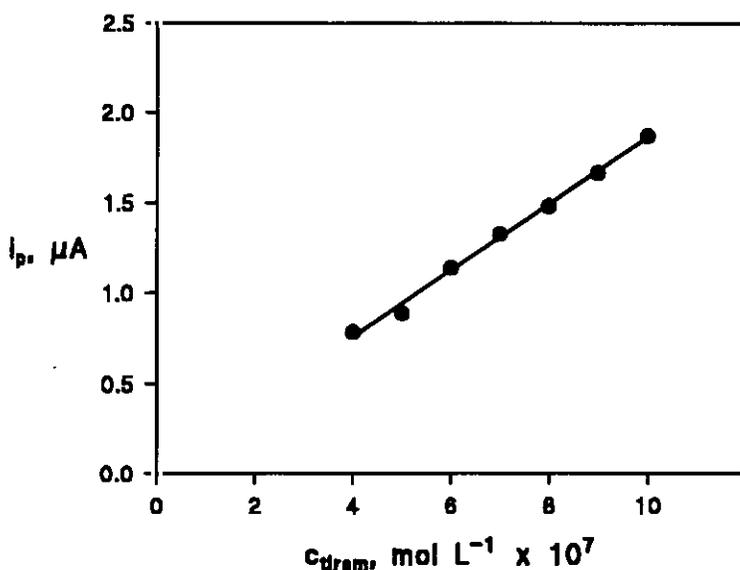


Figura 121

Influencia de la concentración de tiram sobre la intensidad de pico, i_p , mediante LSV, tras la preconcentración por adsorción en continuo del fungicida en medio $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0.1 mol L^{-1} , pH 7.4; Intervalo de concentración: de 4.0×10^{-7} a $10.0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ de tiram; tiempo de acumulación: 3 minutos; $E_{ac} = +1.0 \text{ V}$; caudal: 2.7 mL min^{-1} ; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

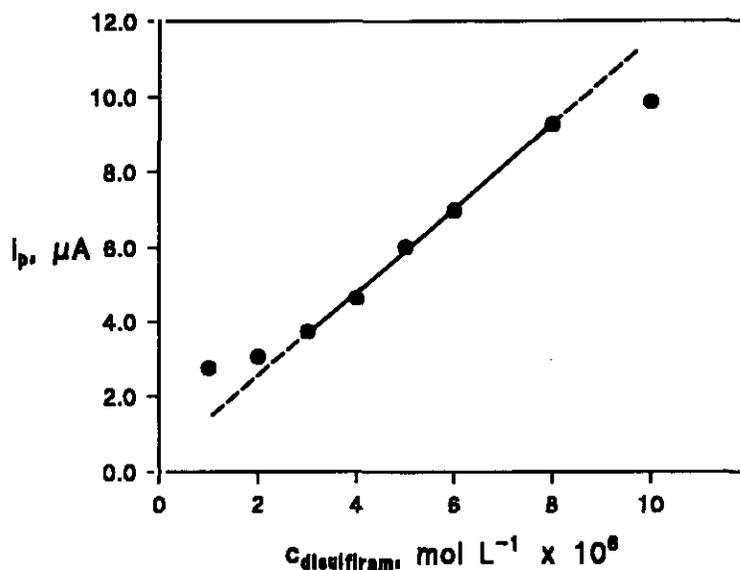


Figura 122

Influencia de la concentración de disulfiram sobre la intensidad de pico, i_p , mediante LSV, tras la preconcentración por adsorción en continuo del fungicida en medio $\text{H}_2\text{PO}_4/\text{HPO}_4^{2-}$ 0.1 mol L^{-1} , pH 7.4; Intervalo de concentración: de 1.0×10^{-6} a 10.0×10^{-6} mol L^{-1} de disulfiram; tiempo de acumulación: 5 minutos; $E_{\text{ac}} = +1.0$ V; caudal: 2.7 mL min^{-1} ; $v = 50$ mV s^{-1} .

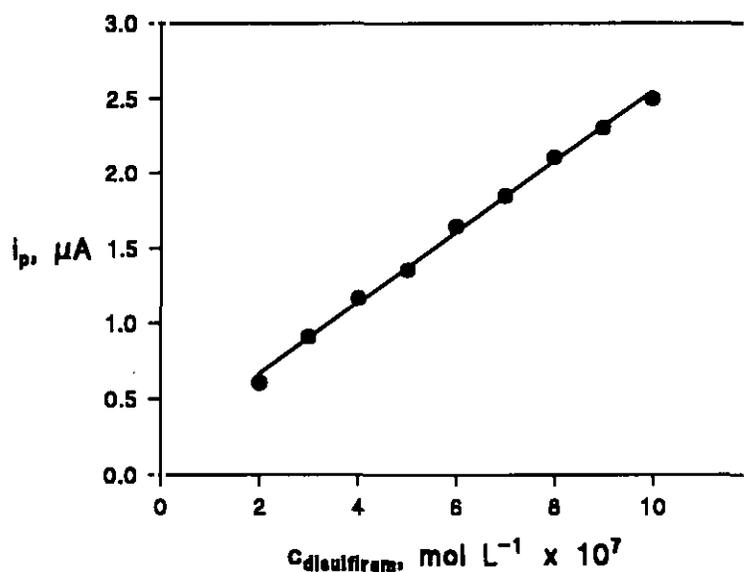


Figura 123

Influencia de la concentración de disulfiram sobre la intensidad de pico, i_p , mediante LSV, tras la preconcentración por adsorción en continuo del fungicida en medio $\text{H}_2\text{PO}_4/\text{HPO}_4^{2-}$ 0.1 mol L^{-1} , pH 7.4; Intervalo de concentración: de 2.0×10^{-7} a 10.0×10^{-7} mol L^{-1} de disulfiram; tiempo de acumulación: 4 minutos; $E_{\text{ac}} = +1.0$ V; caudal: 2.7 mL min^{-1} ; $v = 50$ mV s^{-1} .

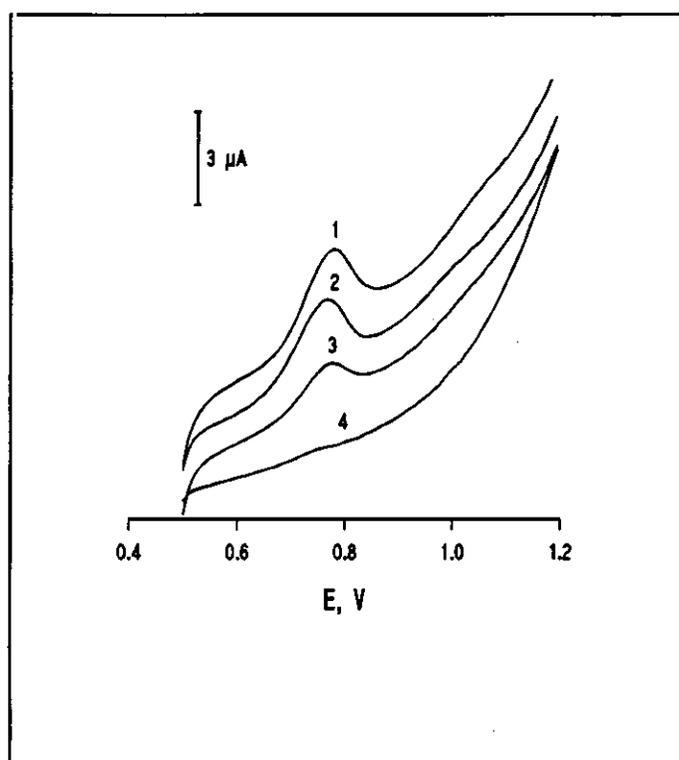
Como puede observarse en la Tabla LXVIII, la pendiente de los calibrados es mayor, en ambos casos, para los intervalos de concentración inferiores, como es de esperar en los procesos de adsorción debido a que se acerca el exceso superficial de los fungicidas al exceso superficial a saturación.

Si se comparan las características analíticas con las obtenidas mediante análisis por inyección en flujo convencional (Tabla LX), puede deducirse que el método de preconcentración en continuo es más sensible puesto que los valores de las pendientes de los calibrados análogos son mayores en este caso. Sin embargo, el intervalo de linealidad es ahora más estrecho y no se pueden alcanzar límites de detección inferiores.

III.5.1.7.5.- *Estudio de interferencias*

El aspecto más interesante de la metodología empleando preconcentración en continuo es la posibilidad de mejorar la selectividad de las determinaciones. Siguiendo el procedimiento propuesto, sólo las especies electroactivas que se adsorban sobre la superficie del electrodo originarán una señal analítica. En este contexto, se investigó la posible interferencia de los mismos compuestos ensayados en FIA convencional.

En la Figura 124 se muestran los voltamperogramas obtenidos al aplicar el procedimiento descrito cuando se hace circular por la célula de flujo disoluciones 1.0×10^{-6} mol L⁻¹ de tiram, disulfiram y ziram, y una disolución 5.0×10^{-5} mol L⁻¹ de fenol. Tanto el tiram ($E_p = 0.768$ V), como el disulfiram ($E_p = 0.780$ V) y el ziram ($E_p = 0.775$ V) presentan señales de oxidación bien definidas a este nivel de concentración. Sin embargo, el fenol no mostró ninguna respuesta en el intervalo de potenciales barrido, a un nivel de concentración 50 veces superior al de los fungicidas, lo que indica que no se adsorbe sobre el electrodo en estas condiciones.

**Figura 124**

Voltamperogramas, en LSV, tras la preconcentración por adsorción en continuo de: (1) disulfiram 1.0×10^{-6} mol L⁻¹, (2) tiram 1.0×10^{-6} mol L⁻¹, (3) ziram 1.0×10^{-6} mol L⁻¹ y (4) fenol 5.0×10^{-5} mol L⁻¹, en medio $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0.1 mol L⁻¹, pH 7.4; tiempo de acumulación: 3 minutos; $E_{ac} = +1.0$ V; caudal: 2.7 mL min^{-1} ; velocidad de barrido: 50 mV s^{-1} .

En la Tabla LXIX se recogen los datos relativos a la interferencia de estas especies en la determinación de tiram y disulfiram, tras su preconcentración en continuo. Si se comparan estos resultados con los obtenidos mediante análisis por inyección en flujo (Tablas LXI y LXII), puede destacarse la desaparición de la interferencia producida por el fenol, que no afecta a las medidas de los fungicidas incluso para relaciones fenol:tiram o fenol:disulfiram 50:1. Además, la interferencia producida por el ziram también se reduce considerablemente empleando preconcentración en continuo. Este hecho puede atribuirse a la diferente capacidad de adsorción de los fungicidas, en las condiciones experimentales empleadas, sobre la superficie del electrodo compuesto de grafito-teflón.

Sin embargo, el problema de la interferencia mutua entre tiram y disulfiram empeora ligeramente respecto al método FIA convencional, puesto que ambos compuestos se adsorben fuertemente sobre la superficie del electrodo.

Tabla LXIX

Efecto de la presencia de diversas sustancias sobre las señales de tiram y disulfiram 1.0×10^{-6} mol L⁻¹, en LSV, tras la preconcentración por adsorción en continuo de los fungicidas en medio H₂PO₄⁻/HPO₄²⁻ 0.1 mol L⁻¹, pH 7.4; tiempo de acumulación: 3 minutos para tiram y 4 minutos para disulfiram; E_{ac} = +1.0 V; caudal: 2.7 mL min⁻¹; velocidad de barrido: 50 mV s⁻¹.

Interferente	Relación analito:interferente		i _p , μA (error relativo, %)	
	Tiram	Disulfiram	Tiram	Disulfiram
-	0:1	0:1	2.08	2.35
Tiram	-	1:1	-	4.20 (79%)
Disulfiram	1:1	-	3.21 (54%)	-
Ziram	1:1	1:1	2.76 (33%)	2.82 (20%)
Fenol	50:1	50:1	1.95 (<10%)	2.46 (<10%)
Zn(II)	50:1	50:1	2.00 (<10%)	2.37 (<10%)

III.5.1.8.- Separación en continuo mediante inyección en flujo de tiram y disulfiram

El grave problema de interferencia que origina la presencia de disulfiram sobre la señal amperométrica de tiram, y viceversa, en análisis por inyección en flujo, nos ha llevado a diseñar un esquema de separación en continuo de ambos fungicidas con el fin de poder conseguir su determinación simultánea. Para ello, se incorporó una pequeña columna separadora al sistema FIA. El dispositivo utilizado

se describe en el Apartado II.3.1.1 (Figura 3). El sentido de flujo de la disolución portadora a través de la columna se invierte periódicamente para evitar que la fase estacionaria se compacte en un extremo de la columna y se produzca una disminución en el paso de fluido. Si no se realiza esta inversión, el caudal a la salida de la columna disminuye de 2 a 0.5 mL min⁻¹ después de una hora de empleo continuado, dando lugar a un ensanchamiento de las señales y a resultados poco reproducibles.

III.5.1.8.1.- Elección de la fase móvil y optimización de las variables hidrodinámicas

La adición de metanol o de acetonitrilo a la disolución portadora (regulador fosfato 0.1 mol L⁻¹ de pH 7.4) da lugar a una disminución considerable de las señales amperométricas de ambos fungicidas sobre el electrodo compuesto de grafito-teflón (Tabla LXX).

Tabla LXX

Efecto de la proporción de metanol o acetonitrilo en la fase móvil (H₂PO₄⁻/HPO₄²⁻ 0.1 mol L⁻¹, pH 7.4) sobre la corriente de fondo (i_f) y la intensidad de pico (i_p) de tiram 5.0x10⁻⁶ mol L⁻¹ obtenidas mediante inyección en flujo con detección amperométrica empleando como electrodo indicador un electrodo compuesto de grafito-40% teflón. Caudal: 1.9 mL min⁻¹; V_{iny} = 250 μL; E = +1.0 V.

Disolvente orgánico	Proporción en la fase móvil, %	i _f , μA	i _p , μA
—	0	0.15	1.20
Metanol	25	0.76	0.24
Metanol	50	1.53	0.06
Acetonitrilo	25	0.53	0.36
Acetonitrilo	50	0.95	0.07

Como puede observarse en la Tabla LXX, la disminución en la intensidad de pico fue más acusada cuando se empleó metanol. Por este motivo, se ha decidido emplear, como fase móvil, una mezcla de acetonitrilo y regulador fosfato de pH 7.4 que permite la separación de tiram y disulfiram en la columna acoplada al sistema FIA.

Empleando una concentración de cada fungicida de 5.0×10^{-6} mol L⁻¹ y un volumen de inyección de 250 μ L, se obtiene una buena resolución utilizando una proporción acetonitrilo:fosfato 25:75 v/v, como puede observarse en la Figura 125 A. Si el porcentaje de acetonitrilo en la fase móvil se rebaja al 20%, se produce un ensanchamiento y una disminución sustancial del pico del disulfiram.

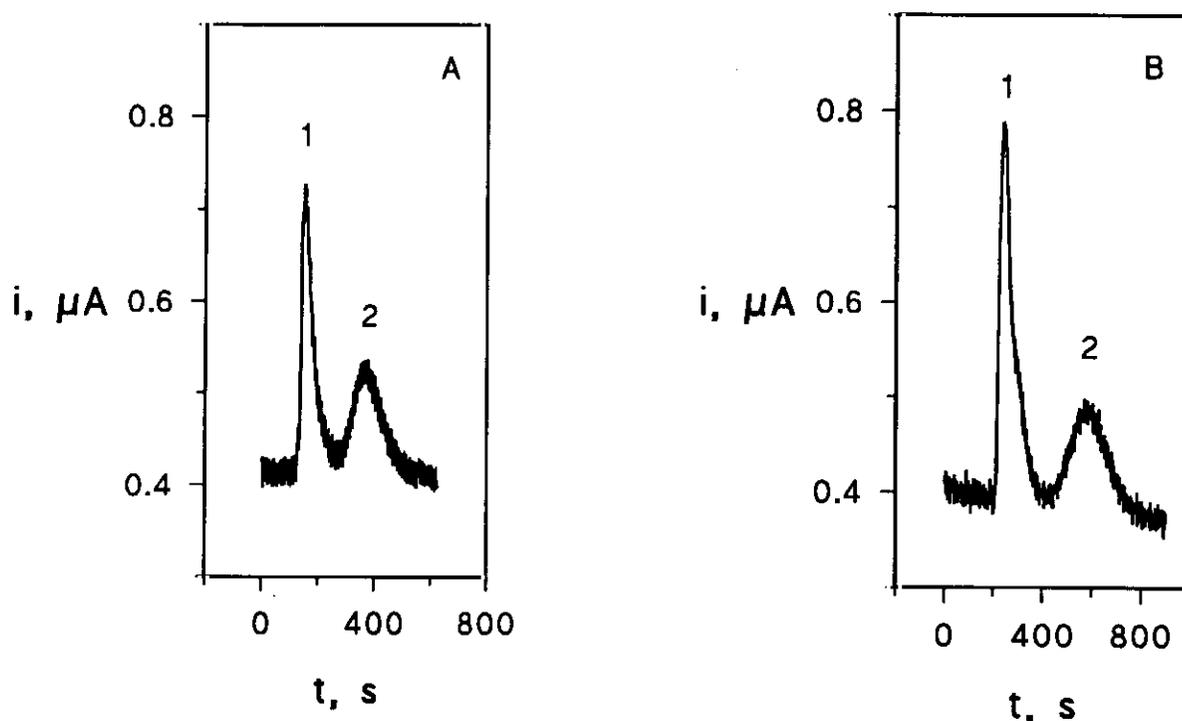


Figura 125

Señales obtenidas, mediante inyección en flujo con detección amperométrica, para una mezcla de 5.0×10^{-6} mol L⁻¹ de tiram (1) y disulfiram (2), tras su separación en una columna empaquetada con fase estacionaria VYDAC SC-201 RP. Fase móvil: (A) 25:75, (B) 23:77 acetonitrilo:regulador fosfato (pH 7.4). Caudal: 1.9 mL min⁻¹; volumen de inyección: (A) 250 μ L, (B) 650 μ L; E= +1.0 V.

En la Figura 126 se muestra el efecto del volumen de inyección sobre las señales de tiram y disulfiram. Como compromiso entre una mayor sensibilidad y una buena resolución de las señales, se ha escogido un volumen de 650 μL . La separación hasta la línea base puede conseguirse en estas condiciones si se rebaja el porcentaje de acetonitrilo en la fase móvil al 23%, como se muestra en la Figura 125 B.

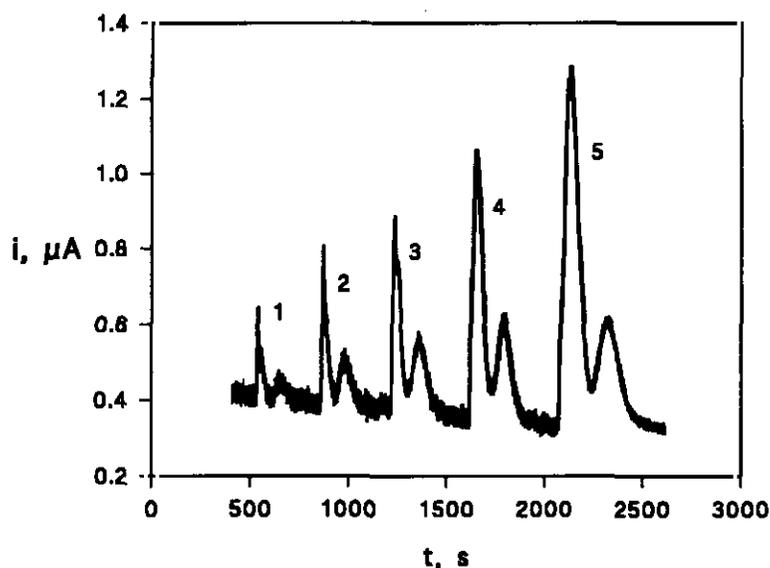


Figura 126

Efecto del volumen de inyección sobre las señales de tiram y disulfiram obtenidas mediante inyección en flujo con detección amperométrica, tras su separación en una columna empaquetada con fase estacionaria VYDAC SC-201 RP. Fase móvil: 25:75 acetonitrilo:regulador fosfato (pH 7.4). Caudal: 1.9 mL min⁻¹; volumen de inyección: (1) 150, (2) 250, (3) 350, (4) 650, (5) 1150 μL ; E= +1.0 V.

III.5.1.8.2.- *Curvas de calibrado*

Empleando una fase móvil constituida por 23:77 acetonitrilo:regulador fosfato 0.1 mol L⁻¹ de pH 7.4, un caudal de 1.9 mL min⁻¹ y un volumen de inyección de 650 μL , se han obtenido relaciones lineales entre el área de pico y la concentración de

tiram y disulfiram entre 2.0×10^{-6} y 10.0×10^{-6} mol L⁻¹ (Tabla LXXI y Figura 127). Estos resultados demuestran la posibilidad de determinar simultáneamente tiram y disulfiram en muestras en las que coexistan ambos fungicidas.

Tabla LXXI

Curvas de calibrado para tiram y disulfiram, obtenidas mediante análisis por inyección en flujo tras la separación en continuo de tiram y disulfiram. Fase móvil: 23:77 acetonitrilo:regulador fosfato (pH 7.4). Caudal: 1.9 mL min⁻¹; volumen de inyección: 650 µL; E= +1.0 V.

Fungicida	Intervalo lineal, mol L ⁻¹	Coefficiente de correlación	Pendiente, A s L mol ⁻¹	Ordenada en el origen, A s
Tiram	2.0×10^{-6} - 10.0×10^{-6}	0.9990	3.1 ± 0.3	$(-0.8 \pm 1.8) \times 10^6$
Disulfiram	2.0×10^{-6} - 10.0×10^{-6}	0.9991	3.2 ± 0.2	$(1.5 \pm 1.6) \times 10^6$

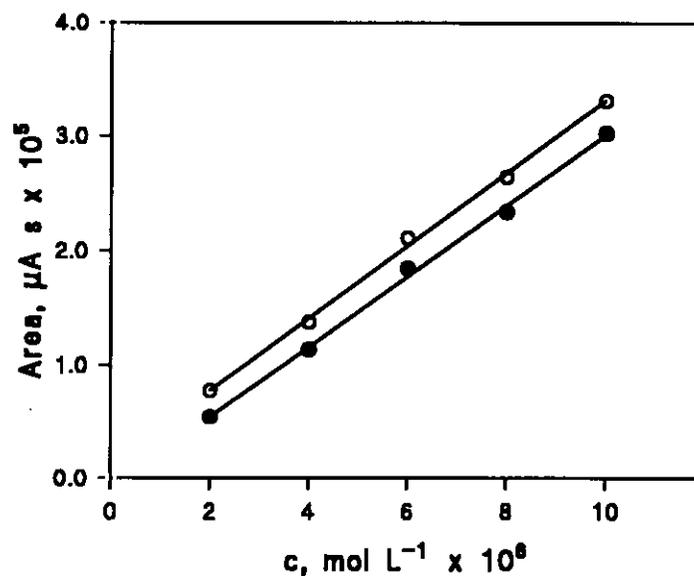


Figura 127

Influencia de la concentración de tiram (●) y disulfiram (○) sobre el área de pico, mediante análisis por inyección en flujo tras la separación en continuo de los fungicidas. Fase móvil: 23:77 acetonitrilo:regulador fosfato (pH 7.4). Caudal: 1.9 mL min⁻¹; volumen de inyección: 650 µL; E= +1.0 V.

III.5.2.- DETERMINACION DE TIRAM Y DISULFIRAM MEDIANTE HPLC CON DETECCION AMPEROMETRICA

Como se ha visto en el apartado anterior, la determinación conjunta de tiram y disulfiram mediante análisis por inyección en flujo con detección amperométrica está sujeta a la interferencia mutua entre ambos fungicidas, siendo necesario recurrir a su separación previa. Además, la presencia de otras sustancias, tales como ziram o fenol, también origina graves interferencias sobre las señales amperométricas de tiram y disulfiram.

Por este motivo y con objeto de evaluar los electrodos compósitos de grafito-teflón como detectores amperométricos en HPLC, se ha escogido la determinación conjunta de tiram y disulfiram en presencia de ziram como problema analítico para desarrollar un método cromatográfico apropiado.

La optimización de las condiciones experimentales, tales como la elección del disolvente orgánico utilizado en la fase móvil, así como su porcentaje, el potencial aplicado al electrodo compósito y el tiempo transcurrido entre la mezcla de carbamatos y la inyección de dicha mezcla se ha llevado a cabo empleando una configuración de célula de flujo de tipo wall-jet. La composición del electrodo indicador, es decir, una mezcla de grafito y 40% de teflón, así como el componente acuoso de la fase móvil (regulador fosfato de pH 7.4) son los mismos que los utilizados en capítulos precedentes.

III.5.2.1.- Elección de la fase móvil

Antes de incorporar la columna cromatográfica al sistema, se realizaron experimentos con el fin de evaluar la variación de la respuesta amperométrica del electrodo compósito de grafito-40% teflón cuando se rebaja la polaridad de una

disolución de regulador fosfato 0.01 mol L^{-1} de pH 7.4, empleada como portador, debido a la adición de diferentes proporciones de metanol o acetonitrilo. Para ello, se inyectaron en el sistema desprovisto de la columna cromatográfica, alícuotas de disoluciones de $60 \mu\text{g L}^{-1}$ de tiram, preparadas en el mismo medio que el portador, empleando un caudal de 2.0 mL min^{-1} y aplicando al electrodo indicador un potencial de $+1.0 \text{ V}$.

Al aumentar el contenido de disolvente orgánico se observó una fuerte disminución de la intensidad de pico y un aumento de la corriente de fondo (ver Tabla LXX). Así, empleando un 25% de metanol en la fase móvil, la señal amperométrica disminuía un 80%. Si el porcentaje de metanol se incrementa hasta un 50%, la disminución en la intensidad de pico era del 95%. Cuando se utilizó una proporción de metanol del 75%, el ruido de la línea base era mayor que la señal analítica obtenida.

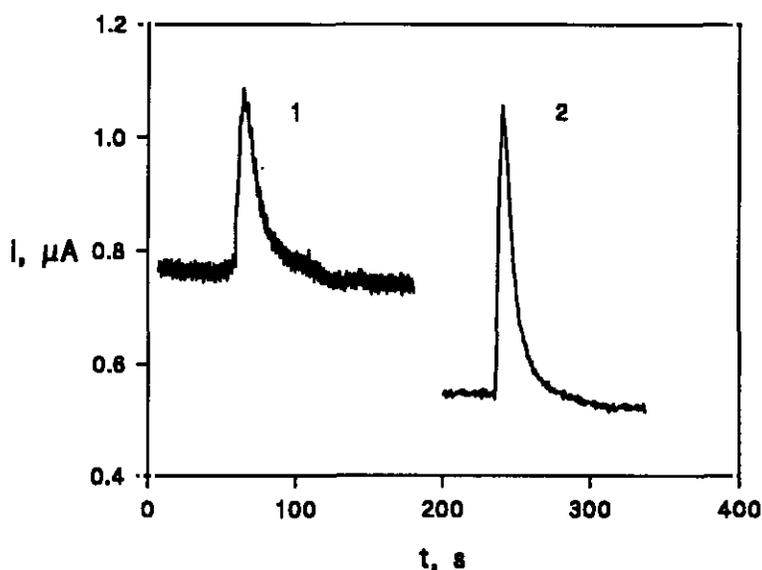


Figura 128

Señales obtenidas cuando se inyectan $0.15 \mu\text{g}$ de tiram en el sistema desprovisto de columna separadora, empleando como fase móvil $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0.1 mol L^{-1} , pH 7.4 modificada con un 25% de: (1) metanol, (2) acetonitrilo. Caudal: 2.0 mL min^{-1} ; $V_{\text{iny}} = 10 \mu\text{L}$; $E = +1.0 \text{ V}$.

Cuando se empleó acetonitrilo como modificador orgánico de la fase móvil, la disminución de la señal fue algo menor. Por ejemplo, cuando el contenido de acetonitrilo en la fase móvil era del 25%, la intensidad de pico era un 70% menor que la obtenida en medio regulador fosfato 0.01 mol L⁻¹. Sin embargo, el nivel de ruido y la corriente de fondo son considerablemente menores que cuando se empleó metanol (Figura 128). Para una proporción del 75% de acetonitrilo se observó precipitación de fosfato.

Teniendo en cuenta estos resultados, se ha escogido acetonitrilo como modificador de la fase móvil.

III.5.2.2.- Influencia del potencial aplicado

En el apartado III.5.1.1 se ha discutido la elección de un valor del potencial aplicado al electrodo indicador de +1.0 V cuando se llevó a cabo detección amperométrica de tiram y disulfiram en un sistema FIA empleando una disolución portadora acuosa. Con objeto de averiguar si la presencia de acetonitrilo en la fase móvil puede alterar el valor de potencial más apropiado para realizar la detección amperométrica, se efectuaron medidas de la corriente de pico para distintos valores de potencial, en el intervalo +0.50-+1.20 V, cuando se inyectaron 10 µL de una disolución de 180 µg mL⁻¹ de tiram en una fase móvil constituida por una mezcla de acetonitrilo:regulador fosfato 0.01 mol L⁻¹ de pH 7.4 40:60 v/v, en ausencia de columna separadora. Los datos obtenidos se representan en la Figura 129.

La forma de la curva es muy parecida a la obtenida en ausencia de acetonitrilo en la disolución portadora (véase la Figura 97), con una meseta de intensidades bien definida entre +0.90 y +1.1 V. Por consiguiente, se ha escogido para estudios subsiguientes el mismo valor de potencial de +1.0 V para ser aplicado al electrodo compuesto de grafito-teflón utilizado como indicador.

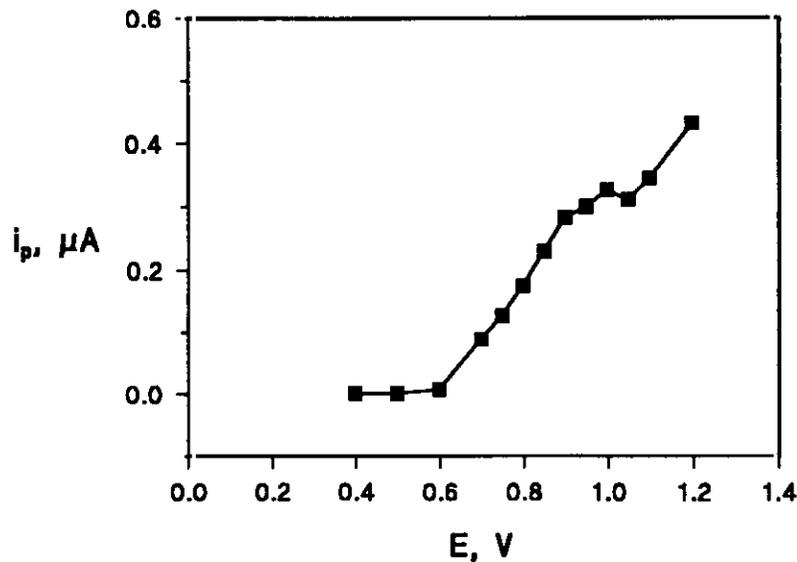


Figura 129

Influencia del potencial aplicado sobre la intensidad de pico de $180 \mu\text{g L}^{-1}$ de tiram, sobre un electrodo compuesto de grafito-40% teflón, empleando como portador acetonitrilo: regulador fosfato 0.1 mol L^{-1} (pH 7.4) 40:60; caudal: 2.0 mL min^{-1} .

III.5.2.3.- Comparación de la respuesta del electrodo compuesto de grafito-teflón con un electrodo de carbono vitrificado

Un aspecto muy importante por lo que respecta a la aplicabilidad y a la utilidad real como detector amperométrico en sistemas en flujo del electrodo de grafito-teflón, es comprobar si este material mejora las prestaciones de los materiales electródicos normalmente empleados en los detectores electroquímicos. Entre éstos, el electrodo de carbono vitrificado puede considerarse como el más ampliamente utilizado, por lo que parece conveniente comparar la respuesta de ambos tipos de materiales electródicos frente a los analitos estudiados. Para ello, se comparó dicha respuesta cuando se realizaron inyecciones sucesivas de $2.25 \mu\text{g}$ de disulfiram en el sistema desprovisto de columna cromatográfica, por el que circula la fase móvil (40:60 v/v acetonitrilo:regulador fosfato 0.01 mol L^{-1} de pH 7.4) a un caudal de 2.0 mL min^{-1} . En la Figura 130 se muestran las señales obtenidas.

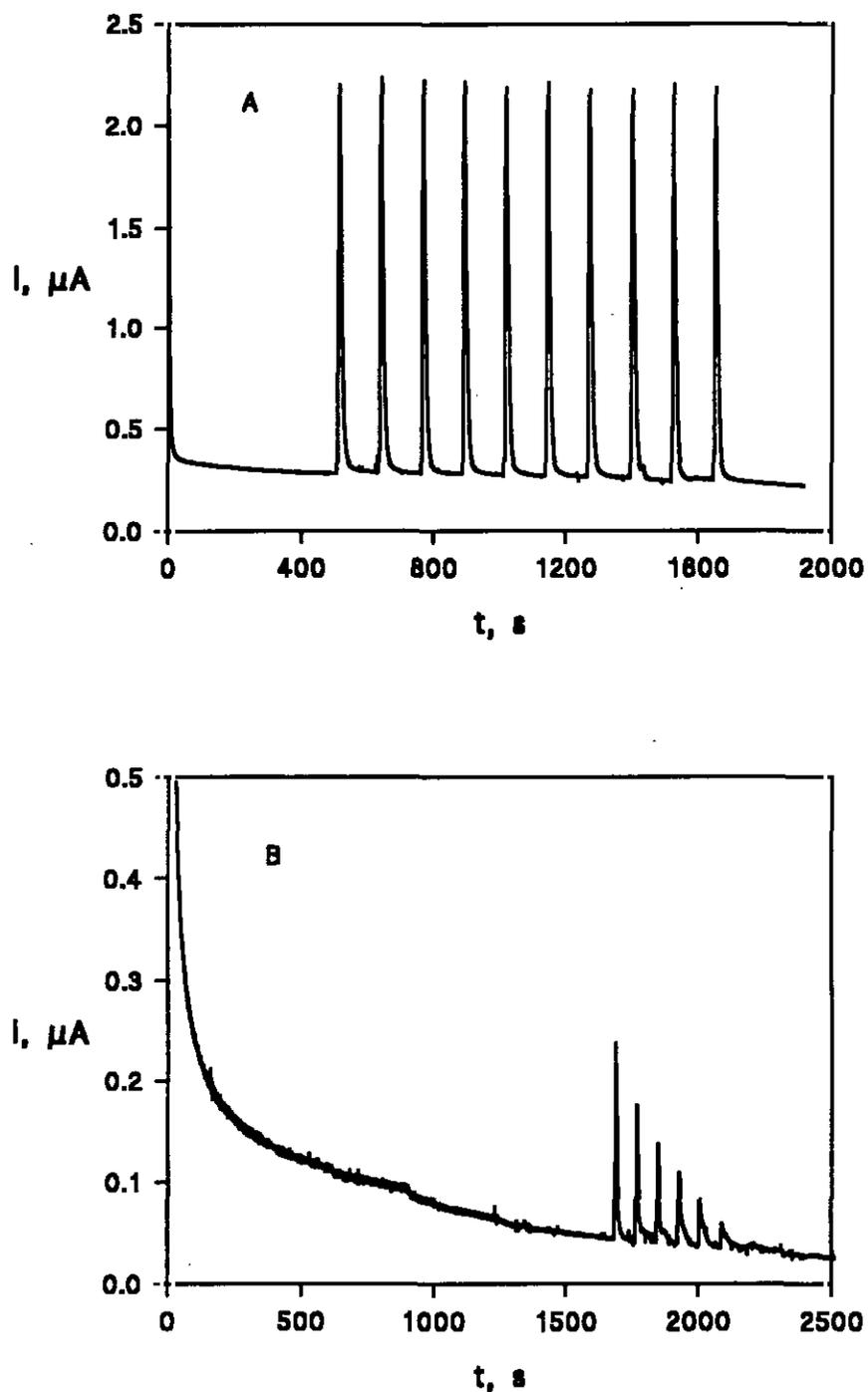


Figura 130

Inyecciones sucesivas de $2.25 \mu\text{g}$ de disulfiram en una disolución portadora constituida por 40:60 v/v acetonitrilo: regulador fosfato 0.1 mol L^{-1} (pH 7.4) que circula a un caudal de 2.0 mL min^{-1} , empleando como electrodo indicador: (A) un electrodo compuesto de grafito-40% teflón y (B) un electrodo de carbono vitrificado.

Como puede observarse, con el electrodo de grafito-teflón se obtiene una respuesta muy reproducible, mientras que empleando el electrodo de carbono vitrificado se produce un fuerte ensuciamiento de la superficie electródica que conduce a una drástica disminución de la señal analítica, la cual desaparece tras 6 inyecciones consecutivas.

Además, puede apreciarse como la magnitud de la intensidad de pico obtenida es mucho mayor sobre el electrodo de grafito-teflón. Otra importante diferencia ventajosa del empleo del electrodo compósito es el menor tiempo que se necesita para alcanzar una línea base estable. Como puede verse en la Figura 130, al cabo de aproximadamente 400 segundos se obtuvo una corriente de fondo estable con el electrodo de grafito-teflón, mientras que fue necesario esperar al menos 1500 segundos para estabilizar la línea base cuando se utilizó el electrodo de carbono vitrificado.

Todas estas importantes ventajas prácticas demuestran la potencialidad de los electrodos compósitos de grafito-teflón para ser utilizados como detectores amperométricos en sistemas en flujo.

III.5.2.4.- Separación de tiram, disulfiram, ziram y fenol

Con objeto de lograr las condiciones experimentales óptimas para poder proceder a la separación de las cuatro especies estudiadas, en primer lugar se ha estudiado el efecto de la proporción de acetonitrilo empleado en la fase móvil sobre las características de retención de tiram, disulfiram, ziram y fenol. En la Tabla LXXII se muestran los factores de capacidad obtenidos para estos compuestos cuando se inyectaron 0.6 μg de cada uno de ellos individualmente en las fases móviles con diferentes proporciones de acetonitrilo. Como puede deducirse, el ziram no interaccionó con la fase estacionaria utilizada y su tiempo de retención coincide

prácticamente con el valor de t_0 calculado a partir de los datos de control de calidad de la columna. No obstante, cuando se inyectó acetonitrilo puro en el sistema, no se observó ninguna perturbación de la línea base a t_0 , por lo que la determinación de ziram podría llevarse a cabo sin dificultad. Los valores de k' que aparecen en la Tabla LXXII se han calculado tomando el tiempo de retención de ziram como t_0 .

Tabla LXXII

Factores de capacidad obtenidos para tiram, disulfiram, ziram y fenol en fases móviles constituidas por proporciones diferentes de acetonitrilo:regulador fosfato 0.01 mol L⁻¹ (pH 7.4). Cantidad inyectada: 0.6 µg de cada sustancia. Caudal: 2.0 mL min⁻¹.

Fungicida	Fase móvil			
	Acetonitrilo:regulador fosfato 0.01 mol L ⁻¹			
	40:60	45:55	50:50	60:40
Ziram	0	0	0	0
Fenol	2.0	1.3	1.1	0.9
Tiram	7.0	4.2	3.0	2.0
Disulfiram	32.3	28.6	15.9	7.9

Cuando se utilizaron porcentajes de acetonitrilo en la fase móvil iguales o menores al 40%, el disulfiram presentó tiempos de retención mayores de 30 minutos y, por consiguiente, su señal se ensanchaba demasiado y el tiempo de análisis aumentaba considerablemente.

Por otra parte, como era de esperar, al aumentar el contenido de acetonitrilo en la fase móvil, el área de pico disminuyó considerablemente, tanto para el tiram como para el disulfiram, como consecuencia de la disminución en el coeficiente de difusión al variar la fuerza iónica y la viscosidad del medio. La resolución hasta la

línea base de las señales de ziram, tiram y disulfiram se consiguió empleando un contenido de acetonitrilo del 45% en la fase móvil (Figura 131).

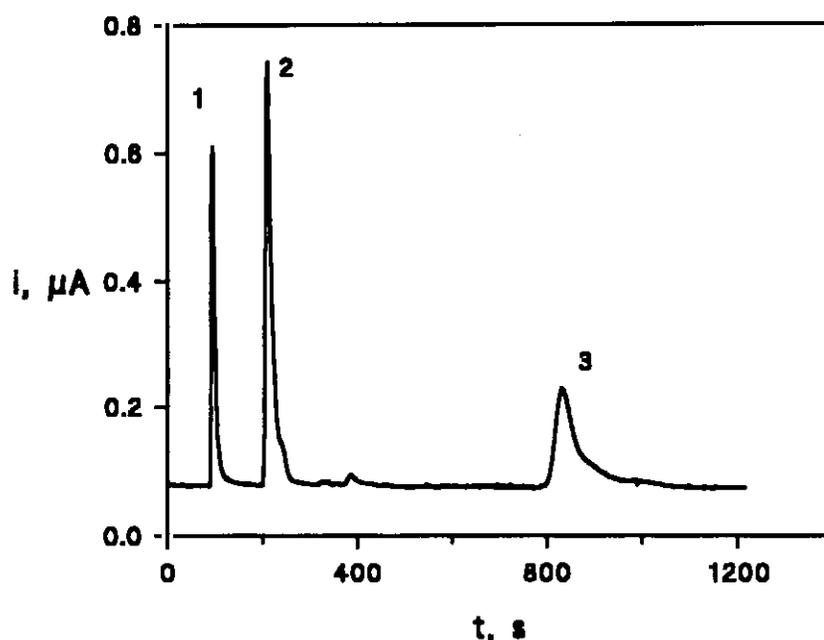


Figura 131

Cromatogramas obtenidos para una mezcla de $45 \mu\text{g mL}^{-1}$ de ziram (1), $80 \mu\text{g mL}^{-1}$ de tiram (2) y $80 \mu\text{g mL}^{-1}$ de disulfiram, empleando como fase móvil una mezcla 45:55 acetonitrilo:regulador fosfato 0.01 mol L^{-1} (pH 7.4); caudal: 2.0 mL min^{-1} ; $V_{\text{iny}} = 10 \mu\text{L}$; $E = +1.0 \text{ V}$.

Un aspecto analítico importante del problema planteado con esta separación es que se observó que al inyectar una mezcla de tiram y disulfiram inmediatamente después de su preparación, aparecían los dos picos correspondientes en el cromatograma, pero que, si la inyección se realizaba transcurridos unos pocos minutos después de preparar la disolución, aparecía un tercer pico en el cromatograma con un tiempo de retención intermedio ($k' = 6.9$ para un 50% de acetonitrilo). Este pico corresponde probablemente al N,N-dietil-N',N'-dimetiltiuram disulfuro, habiéndose descrito este efecto previamente por Smith y col. [77], que puede atribuirse a la rotura del enlace -S-S- central y posterior recombinación de los fragmentos procedentes de moléculas diferentes.

En la Figura 132 se muestran los cromatogramas correspondientes a inyecciones de 10 μL de una disolución que contiene 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de tiram y 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de disulfiram, realizadas justo después de la preparación de la mezcla y al cabo de diferentes tiempos transcurridos desde dicha preparación.

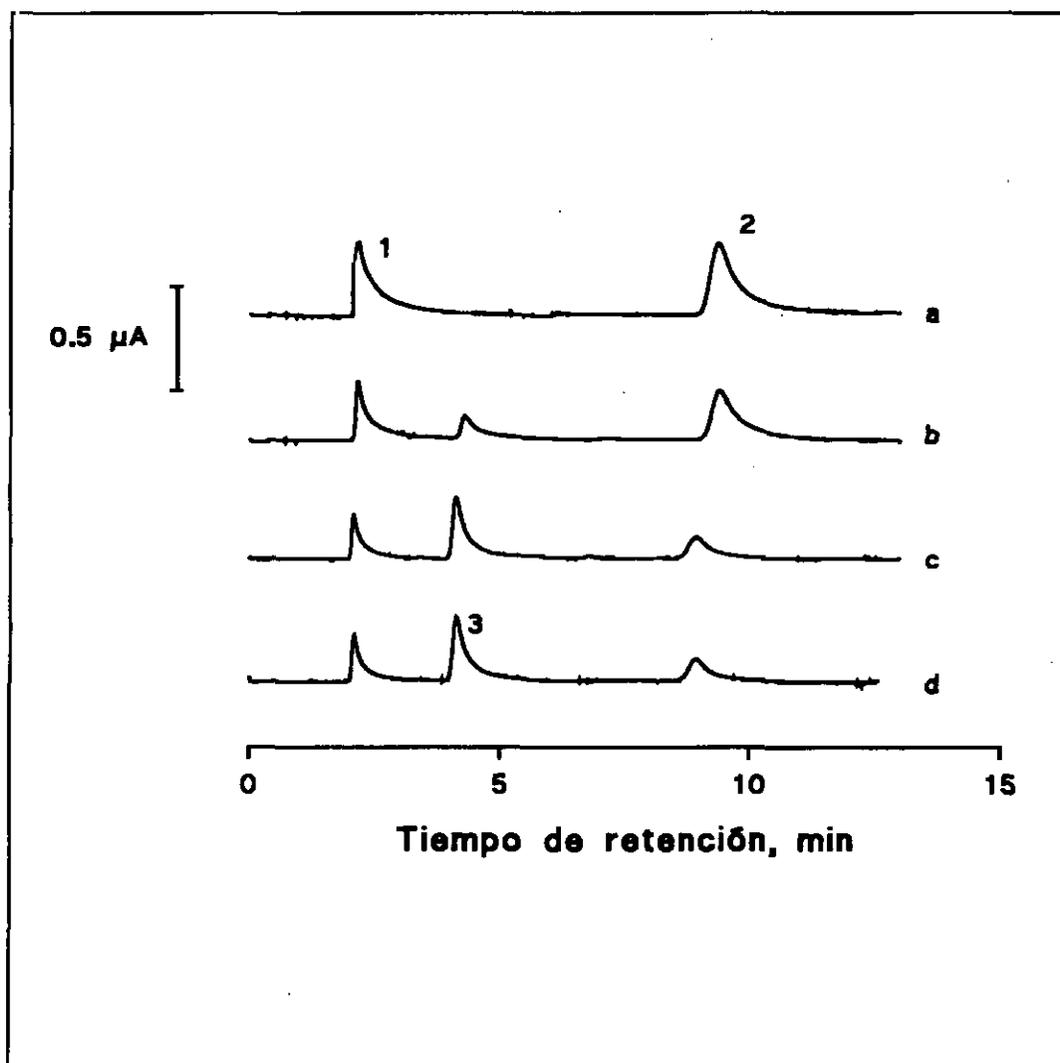


Figura 132

Cromatogramas obtenidos para una mezcla de 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de tiram (1) y 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de disulfiram (2), cuando la inyección se realizó inmediatamente después de la mezcla (a), y al cabo de: (b) 15 minutos, (c) 90 minutos, (d) 180 minutos después de su preparación. (3) N,N-dietil-N',N'-dimetiltiuram disulfuro. Fase móvil: 50:50 acetonitrilo:regulador fosfato 0.01 mol L^{-1} (pH 7.4); caudal: 2.0 mL min^{-1} ; $V_{\text{iny}} = 10 \mu\text{L}$; $E = +1.0 \text{ V}$.

A medida que aumenta el tiempo transcurrido entre la preparación de la disolución y su inyección, disminuye el área de pico del tiram y del disulfiram, mientras que aumenta la señal correspondiente al compuesto de retención intermedia, hasta aproximadamente 90 minutos. Para tiempos superiores, no se observó ninguna variación apreciable en las señales, por lo que se dedujo que, en estas condiciones, se alcanzaba el estado de equilibrio.

El compuesto de retención intermedia mencionado no aparecía en los cromatogramas cuando se inyectaron mezclas de tiram y ziram, incluso aunque dicha inyección se realizara después de 90 minutos de haber preparado la disolución de la mezcla binaria. Por el contrario, cuando se cromatografió una mezcla de ziram y disulfiram transcurridos unos pocos minutos desde su preparación, aparecieron cuatro picos en el cromatograma, con factores de capacidad de 0, 3.0, 6.4 y 15.7 cuando se empleó un 50% de acetonitrilo en la fase móvil (Figura 133). El tiempo de retención del segundo eluato coincide con el tiempo de retención del tiram en estas mismas condiciones, de forma que puede deducirse que en la disolución coexistían ziram, tiram, disulfiram y el mencionado N,N-dietil-N',N'-dimetiluram disulfuro.

La resolución hasta la línea base de los picos correspondientes a estos cuatro compuestos se consiguió utilizando una fase móvil constituida por acetonitrilo:regulador fosfato 0.01 mol L⁻¹ de pH 7.4 45:55 y un caudal de 2.0 mL min⁻¹. Por consiguiente, estas condiciones experimentales han sido las escogidas para la realización de los calibrados y la determinación de tiram en muestras de manzanas.

Sin embargo, si la disolución de trabajo contiene fenol, su señal solapa con el pico del ziram, aunque no interfiere en la determinación de tiram y disulfiram. Si se quiere llevar a cabo una separación completa de todos los compuestos, incluido el fenol, es necesario rebajar el porcentaje de acetonitrilo utilizado en la fase móvil, así como modificar el caudal durante el desarrollo del cromatograma con el fin de

evitar una excesiva retención del disulfiram. Dicho aumento del caudal provocó deriva en la línea base, como ocurriría si el problema se resolviera empleando un gradiente de fase móvil. En la Figura 134 se muestra el cromatograma obtenido para una mezcla de ziram, fenol, tiram y disulfiram, empleando un 38% de acetonitrilo en la fase móvil y un caudal de 1.5 mL min^{-1} entre los puntos marcados con (a) y (b), y de 5 mL min^{-1} a partir de (b). La inyección de una alícuota de $10 \mu\text{L}$ se realizó inmediatamente después de la preparación de la mezcla.

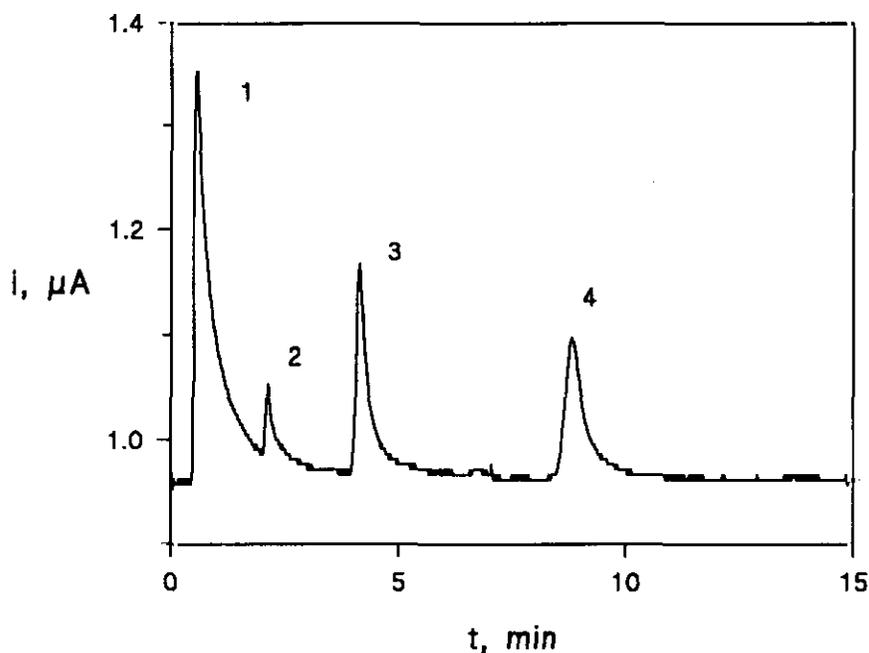


Figura 133

Cromatograma obtenido para una mezcla de $60 \mu\text{g mL}^{-1}$ de ziram (1) y $60 \mu\text{g mL}^{-1}$ de disulfiram (4), cuando la inyección se realizó después de 90 minutos de la preparación de la disolución. (2) tiram y (3) N,N-diethyl-N',N'-dimethyltiram disulfuro. Fase móvil: 50:50 acetonitrilo:regulador fosfato 0.01 mol L^{-1} (pH 7.4); caudal: 2.0 mL min^{-1} ; $V_{\text{iny}} = 10 \mu\text{L}$; $E = +1.0 \text{ V}$.

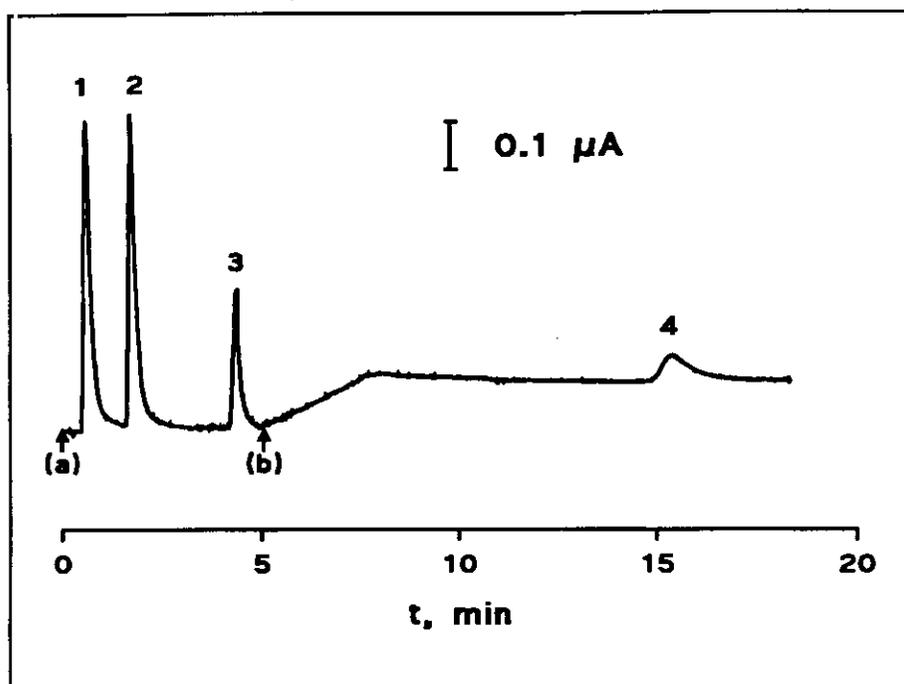


Figura 134

Cromatograma obtenido para una mezcla de $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ de ziram (1), $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ de fenol (2), $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ de tiram (3) y $60 \mu\text{g mL}^{-1}$ de disulfiram (4), inyectada inmediatamente después de la preparación de la disolución. Fase móvil: 38:62 acetonitrilo:regulador fosfato 0.01 mol L^{-1} (pH 7.4). Caudal: 1.5 mL min^{-1} desde (a) hasta (b) y 5.0 mL min^{-1} a partir de (b). $V_{\text{iny}} = 10 \mu\text{L}$; $E = +1.0 \text{ V}$.

III.5.2.5.- Curvas de calibrado. Comparación de las configuraciones wall-jet y thin-layer

En este apartado se han realizado calibrados tanto para tiram como disulfiram en presencia de una concentración constante de ziram ($45 \mu\text{g mL}^{-1}$ en el caso del intervalo de concentraciones superior considerado y $4.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ para el intervalo de concentraciones inferior).

Con fines comparativos, se han empleado dos configuraciones diferentes de la célula de flujo para obtener dichas curvas de calibrado, una la ya empleada de tipo

wall-jet y otra con la configuración thin-layer. En la Tabla LXXIII se recogen las características de los calibrados obtenidos. A modo de ejemplo, en la Figura 135 se muestran los cromatogramas utilizados para construir el calibrado correspondiente al intervalo superior de concentraciones ensayado cuando se utiliza la configuración thin-layer en la célula de flujo.

Tabla LXXIII

Calibrados obtenidos para tiram y disulfiram, en presencia de ziram, mediante HPLC con detección amperométrica sobre un electrodo compuesto de grafito-40%teflón, empleando configuración wall-jet y thin-layer; $E_p = +1.0$ V; Fase móvil: 45:55 acetonitrilo:regulador fosfato 0.01 mol L^{-1} (pH 7.4). Caudal: 2.0 mL min^{-1} ; $V_{inj} = 10$ μ L.

Fungicida	Configuración célula de flujo	Intervalo lineal, mg L^{-1}	Coefficiente de correlación	Pendiente, μ A s mg^{-1}	Ordenada en el origen, μ A s
Tiram	Wall-jet	2-10	0.998	0.212 ± 0.008	-0.039 ± 0.05
		10-100	0.9990	0.24 ± 0.03	-0.7 ± 0.9
	Thin-layer	1-10	0.9993	0.20 ± 0.02	0.01 ± 0.06
		10-100	0.9998	0.1343 ± 0.0002	0.4 ± 0.2
Disulfiram	Wall-jet	6-10	0.99997	0.19 ± 0.02	0.0 ± 0.1
		10-100	0.9992	0.16 ± 0.01	0.3 ± 0.6
	Thin-layer	4-10	0.9990	0.13 ± 0.01	0.01 ± 0.09
		10-100	0.9998	0.123 ± 0.003	0.1 ± 0.2

Como puede apreciarse en la Tabla LXXIII, la sensibilidad es siempre ligeramente mayor cuando se emplea la configuración wall-jet. Sin embargo, la corriente de fondo es considerablemente mayor para esta configuración, así como el ruido en la línea base y el tiempo necesario para la estabilización de dicha línea base antes de efectuar la inyección. Dicho tiempo depende de que el electrodo compuesto de grafito-teflón sea completamente nuevo o haya sido ya utilizado en experimentos anteriores. Cuando el electrodo se emplea por primera vez, se requiere un mayor tiempo de acondicionamiento hasta ofrecer una línea base estable (35-40 minutos en

el caso de la configuración wall-jet y 10-15 minutos en el caso de la configuración thin-layer), mientras que para realizar el segundo o posteriores cromatogramas este período de estabilización se reduce considerablemente (aproximadamente 10 minutos para la configuración wall-jet y menos de 5 minutos para la configuración thin-layer).

Como consecuencia de que la magnitud y el ruido de la corriente de fondo son menores empleando la configuración thin-layer, es posible determinar cantidades algo más bajas de ambos fungicidas con esta configuración.

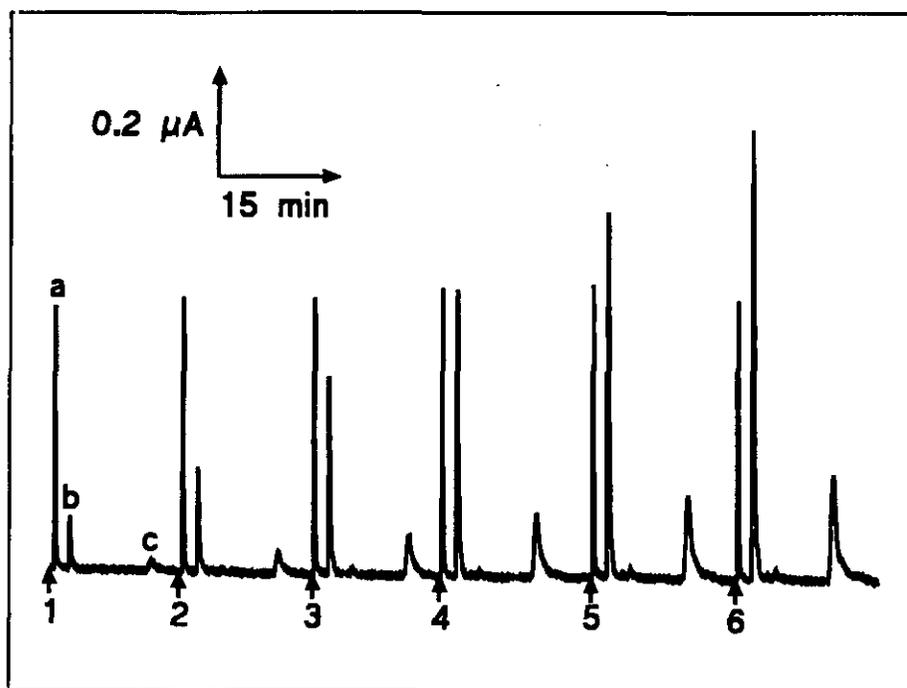


Figura 135

Cromatogramas obtenidos cuando se inyectan disoluciones constituidas por mezclas de $45 \mu\text{g mL}^{-1}$ de ziram con las siguientes cantidades de tíram y disulfiram: (1) 10, (2) 20, (3) 40, (4) 60, (5) 80, (6) $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, empleando configuración thin-layer. $E_{\text{ap}} = +1.0 \text{ V}$; Fase móvil: 45:55 acetonitrilo:regulador fosfato 0.01 mol L^{-1} (pH 7.4). Caudal: 2.0 mL min^{-1} ; $V_{\text{iny}} = 10 \mu\text{L}$.

En la Tabla LXXIV se recogen las características analíticas obtenidas a partir de los calibrados correspondientes. Los valores de la desviación estándar relativa se han calculado a partir de la medida de 10 disoluciones diferentes que contenían $2.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ de tiram, $6.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ de disulfiram y $4.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de ziram en el caso de la configuración wall-jet y $1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ de tiram, $4.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ de disulfiram y $4.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de ziram en el caso de la configuración thin-layer. Los límites de determinación y de detección se han calculado empleando los criterios $10 s$ y $3s_b/m$ definidos en del Apartado III.1.5.

Tabla LXXIV

Características analíticas obtenidas para la determinación de tiram y disulfiram en presencia de ziram, mediante HPLC con detección amperométrica sobre un electrodo compuesto de grafito-40% teflón, empleando configuración wall-jet y thin-layer; $E_{ap} = +1.0 \text{ V}$; Fase móvil: 45:55 acetonitrilo:regulador fosfato 0.01 mol L^{-1} (pH 7.4). Caudal: 2.0 mL min^{-1} ; $V_{iny} = 10 \mu\text{L}$.

Fungicida	Configuración célula de flujo	RSD, %	Límite de determinación, mg L^{-1}	Límite de detección, mg L^{-1}
Tiram	Wall-jet	5.3	1.2	0.4
	Thin-layer	3.4	0.49	0.14
Disulfiram	Wall-jet	6.4	3.4	1.0
	Thin-layer	4.9	2.3	0.7

Como puede deducirse a partir de los datos de la Tabla LXXIV, se han obtenido límites de determinación y de detección inferiores, así como una mejor repetibilidad, tanto para tiram como para disulfiram, cuando se utilizó una configuración thin-layer en la célula de flujo.

III.5.2.6.- Determinación de tiram en manzanas contaminadas

Como aplicación del método desarrollado mediante HPLC con detección amperométrica sobre el electrodo compuesto de grafito-teflón, se ha llevado a cabo la determinación de tiram en muestras de manzanas contaminadas con 0.5 mg de tiram por Kg de manzana, siguiendo el procedimiento descrito en el Apartado II.4.3.3. Como ya se puso de manifiesto en el apartado de Introducción, el tiram se utiliza ampliamente como un activo fungicida, habiéndose encontrado en este tipo de fruta. Las cantidades permitidas en aplicaciones agrícolas son de 0.03-0.01 g Kg⁻¹. En primer lugar, el procedimiento propuesto se aplicó a una muestra de manzanas sin contaminar (muestra blanco).

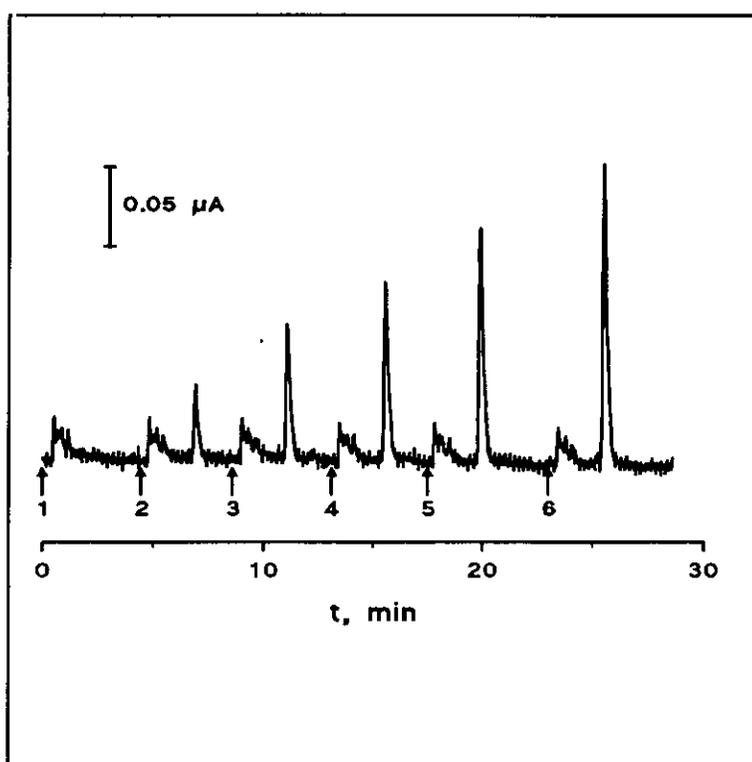


Figura 136

Cromatogramas obtenidos para un extracto de una muestra de manzanas sin contaminar: (1) inyección del blanco, (2-6) adiciones sucesivas de 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de tiram a alícuotas de este extracto. Fase móvil: 45:55 acetonitrilo:regulador fosfato 0.01 mol L⁻¹ (pH 7.4); caudal: 2.0 mL min⁻¹; $V_{\text{iny}} = 10 \mu\text{L}$; $E_{\text{ap}} = +1.0 \text{ V}$.

En la Figura 136 se muestran las señales obtenidas cuando se inyectó una alícuota del extracto de la muestra blanco (1), así como las señales correspondientes a las adiciones sucesivas de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de tiram a alícuotas de dicho extracto (2-6). Los valores de la pendiente y de la ordenada en el origen de la curva de calibrado construida de este modo fueron $0.120 \pm 0.006 \mu\text{A s L mg}^{-1}$ y $0.1 \pm 0.1 \mu\text{A s}$, respectivamente ($r = 0.9995$). Como puede observarse, antes del pico correspondiente al tiram, apareció otra señal en el cromatograma, que puede corresponder a algún compuesto endógeno presente en el extracto de las manzanas, pero que no interfiere en absoluto en la cuantificación del tiram en las condiciones de trabajo escogidas.

El procedimiento mencionado se aplicó seguidamente a la determinación de tiram en 3 muestras de manzanas contaminadas a un nivel de concentración de $0.5 \mu\text{g g}^{-1}$, lo que implica una concentración final de tiram en la disolución analítica de $5.0 \mu\text{g mL}^{-1}$. La concentración media encontrada fue de $4.8 \pm 0.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($0.48 \pm 0.02 \mu\text{g g}^{-1}$), lo que supone una recuperación media del $97 \pm 3 \%$ para un nivel de significación de 0.05. Esta recuperación es mejor que la obtenida por otros autores para el mismo tipo de muestra y el mismo nivel de concentración de tiram, utilizando diferentes métodos basados en HPLC con detección ultravioleta [75,79,93], lo que indica que el método propuesto por nosotros es apropiado para la determinación de tiram en este tipo de muestras.

IV.- CONCLUSIONES



1.- En este trabajo se han desarrollado dos tipos de electrodos compósitos diferentes que contienen grafito en polvo como fase conductora mezclado en cierta proporción con un material aislante que ofrece consistencia a la matriz electródica. Las características físico-químicas de cada fase y la proporción en que se mezclan confieren a los materiales resultantes diversas propiedades que hacen que su utilización como electrodos indicadores presente múltiples ventajas frente al empleo de electrodos convencionales.

Electrodo de pasta de carbono modificado con ftalocianina de cobalto

2.- El primer electrodo desarrollado ha sido un electrodo de pasta de carbono modificado con el mediador redox ftalocianina de cobalto. La pasta de carbono es una matriz electródica fácil de modificar por mezclado directo con los materiales modificadores para conseguir el efecto deseado, lo que constituye una primera ventaja frente a otros materiales electródicos.

3.- La utilización de la ftalocianina de cobalto como mediador redox mezclada íntimamente con la pasta de carbono disminuye el sobrepotencial necesario para que se produzca la oxidación electroquímica de los fungicidas tiram y disulfiram sobre el electrodo. Para ambas sustancias se produce un desplazamiento del potencial de pico hacia valores menos positivos (alrededor de 100 mV) y un aumento de la intensidad de pico (+40% en términos de relación señal-ruido) cuando se emplea el electrodo modificado en comparación con el electrodo de pasta de carbono sin modificar.

4.- Ambos fungicidas se adsorben a circuito abierto sobre la superficie del electrodo de pasta de carbono modificado. Este proceso de adsorción puede utilizarse como etapa de preconcentración efectiva antes de llevar a cabo las medidas cuantitativas de los fungicidas, lo que se traduce en un aumento considerable de la

intensidad de los picos de oxidación obtenidos. La capacidad de preconcentración es mucho más acusada en el caso del disulfiram, probablemente debido a su carácter más hidrofóbico y, por tanto, a su mayor afinidad por el aglutinante apolar de la pasta de carbono.

5.- A pesar de que la adsorción irreversible de los fungicidas sobre el electrodo hace necesaria la renovación de la superficie electródica después de cada medida, la reproducibilidad de las señales analíticas puede considerarse aceptable incluso a los niveles de concentración más bajos. Empleando *voltamperometría diferencial de impulsos* en la etapa de redisolución se obtuvieron límites de detección de 7.1×10^{-8} y 2.2×10^{-8} mol L⁻¹ para tiram y disulfiram, respectivamente.

6.- Estos resultados permiten concluir que los electrodos de pasta de carbono modificados con ftalocianina de cobalto combinan dos aspectos fundamentales que les confieren gran utilidad analítica para la determinación voltamperométrica de fungicidas como el tiram y el disulfiram, como son preconcentración y electrocatálisis. Como prueba de ello, el método desarrollado se aplicó a la determinación de tiram en muestras contaminadas de fresas.

7.- Sin embargo, este electrodo modificado no ofrece tan buenos resultados cuando se pretendió utilizarlo como detector amperométrico en análisis por inyección en flujo. Por una parte, cuando se aplica un potencial constante al electrodo de pasta de carbono modificado, la intensidad de las señales FIA va disminuyendo al realizar inyecciones sucesivas de fungicida, probablemente como consecuencia del ensuciamiento progresivo de la superficie electródica dada la capacidad de los compuestos estudiados para adsorberse sobre la superficie del electrodo modificado. Este problema pudo resolverse de forma satisfactoria aplicando al electrodo indicador un programa de detección amperométrica de impulsos que alterna polarización anódica (para la detección) y catódica (para la limpieza) del electrodo.

8.- Por otro lado, cuando se trabaja en condiciones de elevada sensibilidad, se observa que la corriente de fondo no es estable, sino que aumenta considerablemente con el tiempo, lo que da lugar a una falta considerable de exactitud en las medidas que impide la determinación de los fungicidas a bajos niveles de concentración ($\sim 10^{-7}$ mol L⁻¹). Este efecto se debe al hinchamiento de la pasta de carbono por el contacto prolongado con el caudal de la disolución portadora.

Evaluación cuantitativa de tiram y disulfiram mediante técnicas quimiométricas multivariantes

9.- La proximidad entre los respectivos potenciales de las señales de oxidación electroquímica de tiram y disulfiram mediante voltamperometría diferencial de impulsos sobre el electrodo de pasta de carbono modificado, da lugar a que se obtenga un único pico de oxidación cuando se analizan mezclas de estos dos fungicidas, lo que, obviamente impide su determinación conjunta en una misma muestra con un análisis voltamperométrico directo. Una manera de resolver este problema es mediante la aplicación de técnicas quimiométricas multivariantes, como regresión por componentes principales (PCR), regresión por mínimos cuadrados parciales (PLSR) e incluso el empleo de redes neuronales. Los mejores resultados, en términos de menor error en la predicción cuantitativa de mezclas de ambos fungicidas, se han obtenido mediante la aplicación de redes neuronales de propagación hacia atrás que introducen elementos de cálculo no lineales en el modelo, siendo posible así explicar una posible pérdida de linealidad en las señales analíticas obtenidas para las mezclas de los fungicidas.

Electrodo compuesto de grafito-teflón

10.- El segundo electrodo desarrollado ha sido un electrodo compuesto de grafito-poli(tetrafluoroetileno) -teflón-. El material resultante, con un contenido en teflón del 40%, presenta una resistencia mecánica y química muy superior a la de la pasta de carbono, lo que proporciona al electrodo resultante una serie de cualidades para su empleo como electrodo voltamperométrico y como detector electroquímico en sistemas en flujo.

11.- Mediante voltamperometría de barrido lineal se observó que la adsorción de tiram y disulfiram sobre la superficie del electrodo compuesto es mucho más fuerte que sobre el electrodo de pasta de carbono modificado con ftalocianina de cobalto. Este efecto, que puede estar relacionado con la presencia de cargas electrostáticas superficiales, confiere al electrodo una gran sensibilidad en la respuesta obtenida para la oxidación voltamperométrica de los fungicidas. Esta fuerte adsorción también es responsable del desplazamiento del potencial de pico de los fungicidas hacia valores de potencial aproximadamente 200 mV menos positivos con respecto a la respuesta obtenida con un electrodo de pasta de carbono.

12.- Después de cada medida voltamperométrica, la superficie del electrodo se regenera electroquímicamente aplicando un potencial de -1.2 V durante 30 segundos, lo que constituye una gran ventaja con respecto al empleo de los electrodos de pasta de carbono modificados, que requieren una renovación de la superficie del electrodo con pasta nueva después de cada medida. Además, gracias a la consistencia del material electródico, es posible lijar la superficie del electrodo para obtener un electrodo nuevo cuando sea necesario.

13.- En sistemas en flujo, el empleo del electrodo de grafito-teflón como detector amperométrico ofrece importantes ventajas prácticas, en contraposición a lo comentado con el electrodo de pasta de carbono modificado. Empleando la

metodología característica del análisis por inyección en flujo, no se ha observado ensuciamiento de la superficie del electrodo cuando se realizan inyecciones sucesivas de tiram y de disulfiram a cualquier nivel de concentración, a pesar de la fuerte adsorción de los fungicidas sobre este material electródico observada en discontinuo. Normalmente, la respuesta del electrodo se mantiene constante durante toda la jornada de trabajo sin necesidad de efectuar ningún procedimiento de limpieza o pretratamiento del mismo. Además, el material electródico no se deteriora en contacto con la disolución portadora, incluso cuando ésta contiene proporciones elevadas de un disolvente orgánico. Los límites de detección obtenidos son 4.3×10^{-8} y 2.0×10^{-8} mol L⁻¹ para tiram y disulfiram, respectivamente. La determinación de tiram en aguas contaminadas a un nivel de concentración de 40 µg L⁻¹ proporciona recuperaciones entre el 97 y el 103%.

14.- Los procesos de adsorción que tienen lugar sobre la superficie del electrodo se han aprovechado para desarrollar un método de análisis basado en la preconcentración por adsorción en continuo de los fungicidas. Puesto que sólo originan una señal analítica las especies capaces de adsorberse sobre la superficie del electrodo en las condiciones de trabajo, la técnica es potencialmente mucho más selectiva que el análisis por inyección en flujo convencional.

15.- Mediante el acoplamiento de una pequeña columna de separación al sistema FIA es posible llevar a cabo la separación on-line de tiram y disulfiram de forma sencilla en mezclas binarias de ambos fungicidas.

16.- El electrodo compuesto de grafito-teflón es también apropiado como detector amperométrico en HPLC. La integridad de la matriz electródica en medios de elevado contenido en disolventes orgánicos, como los que se emplean en cromatografía, constituye una gran ventaja frente a otras matrices electródicas como puede ser la pasta de carbono.

17.- Otra importante ventaja es, sin duda alguna, el hecho de que el electrodo no se ensucia tras inyecciones sucesivas de compuestos que presentan gran afinidad por adsorberse sobre su superficie, como pueden ser tiram y disulfiram, al contrario de lo que ocurre con los materiales electródicos normalmente empleados en detección electroquímica en HPLC, como es el carbono vitrificado, cuya respuesta disminuye drásticamente, e incluso desaparece al cabo de 6 o 7 inyecciones sucesivas de fungicida.

18.- Mediante cromatografía líquida de alta resolución es posible determinar tiram y disulfiram en presencia de ziram. Estos tres fungicidas presentan un comportamiento electroquímico muy similar. Todos ellos se adsorben sobre la superficie del electrodo y sus señales voltamperométricas se superponen, de forma que interfieren entre sí, tanto en continuo como en análisis por inyección en flujo, por lo que se ha recurrido a su separación cromatográfica previa a la determinación.

19.- La introducción en el sistema cromatográfico de mezclas de derivados del ácido ditiocarbámico que poseen sustituyentes alquílicos diferentes (metilo en el caso del tiram y ziram, y etilo en el caso del disulfiram), da lugar a cromatogramas con un número de picos superior al número de compuestos que se mezclan, lo que implica que, de alguna manera, las moléculas interaccionan entre sí e intercambian los grupos amino, dando lugar a la formación de compuestos que no estaban inicialmente presentes en la mezcla.

20.- Con fines comparativos, se han empleado dos configuraciones diferentes de la célula de flujo: wall-jet y thin-layer. La configuración thin-layer resulta más apropiada para la detección amperométrica puesto que se obtiene una mejor repetibilidad de las señales, una corriente de fondo más pequeña y con menos ruido y un límite de detección más bajo tanto para el tiram como para el disulfiram.

21.- A modo de aplicación, se llevó a cabo la determinación de tiram en muestras de manzanas contaminadas a un nivel de 0.5 mg de tiram por Kg de manzana, obteniéndose una recuperación media del $97\pm 3\%$. Esta recuperación es mejor que las reportadas en la literatura, para el mismo tipo de muestra y el mismo nivel de concentración del fungicida, empleando distintas metodologías de HPLC con detección ultravioleta.

V.- BIBLIOGRAFIA

- 1.- M. Teresa Sevilla, J. Rodríguez Procopio, J.M. Pinilla y L. Hernández, *Electroanalysis*, **2**, 475 (1990).
- 2.- D.E. Tallman y S.L. Petersen, *Electroanalysis*, **2**, 499 (1990).
- 3.- R.N. Adams, *Anal. Chem.*, **30**, 1576 (1958).
- 4.- R.N. Adams, *Electrochemistry at Solid Electrodes*, Marcel Dekker, New York (1969).
- 5.- E.S. Jacobs, *Anal. Chem.*, **35**, 2112 (1963).
- 6.- T. Kuwana y W.G. French, *Anal. Chem.*, **36**, 241 (1964).
- 7.- K. Kalcher, *Electroanalysis*, **2**, 419 (1990).
- 8.- B.F. Walkins, R.J. Sehling, E. Kariv y L.L. Miller, *J. Am. Chem. Soc.*, **97**, 3549 (1975).
- 9.- G.T. Cheek y R.F. Nelson, *Anal. Lett.*, **11**, 393 (1978).
- 10.- T. Yao y S. Musha, *Anal. Chim. Acta*, **110**, 203 (1979).
- 11.- K. Ravichandran y R.P. Baldwin, *J. Electroanal. Chem.*, **126**, 293 (1981).
- 12.- R.N. Adams, *Rev. Polarog.*, **11**, 71 (1963).
- 13.- K. Štulík y V. Pacáková, *J. Electroanal. Chem.*, **129**, 1 (1981).
- 14.- J. Wang, *Anal. Chim. Acta*, **234**, 41 (1990).
- 15.- I. Švancara y K. Vytras, *Chem. Listy*, **88(7)**, 412 (1994).
- 16.- K. Kalcher, J.M. Kauffmann, J. Wang, I. Švancara, K. Vytras, C. Neuhold y Z. Yang, *Electroanalysis*, **7**, 5 (1995).
- 17.- J. Arcos, J.M. Kauffmann, G.J. Patriarcho y P. Sánchez-Batanero, *Anal. Chim. Acta*, **236**, 299 (1990).
- 18.- E.G. Cookeas y C.E. Efstathiou, *Analyst*, **117**, 1329 (1992).
- 19.- N.E. Zoulis, D.P. Nikolelis y C.E. Efstathiou, *Analyst*, **115**, 291 (1990).
- 20.- E.N. Chaney Jr. y R.P. Baldwin, *J. of Chromatogr.*, **345**, 43 (1985).
- 21.- K.M. Korfhage, K. Ravichandran y R.P. Baldwin, *Anal. Chem.*, **56**, 1514 (1984).
- 22.- M.K. Halbert y R.P. Baldwin, *Anal. Chem.*, **57**, 591 (1985).
- 23.- M.K. Halbert y R.P. Baldwin, *J. of Chromatogr.*, **345**, 43 (1985).
- 24.- L.M. Santos y R.P. Baldwin, *Anal. Chem.*, **58**, 848 (1986).

- 25.- L.M. Santos y R.P. Baldwin, *J. of Chromatogr.*, **414**, 161 (1987).
- 26.- M.K. Halbert y R.P. Baldwin, *Anal. Chim. Acta*, **187**, 89 (1986).
- 27.- L.M. Santos y R.P. Baldwin, *Anal. Chem.*, **59**, 1766 (1987).
- 28.- L.M. Santos y R.P. Baldwin, *Anal. Chim. Acta*, **206**, 85 (1988).
- 29.- A.M. Tolbert y R.P. Baldwin, *Electroanalysis*, **1**, 389 (1989).
- 30.- A.M. Tolbert, R.P. Baldwin y L.M. Santos, *Anal. Lett.*, **22**, 683 (1989).
- 31.- J. Wang y J.M. Zadeii, *J. Electroanal. Chem.*, **249**, 339 (1988).
- 32.- J. Wang, L. Angnes, C. Liang y O. Evans, *Talanta*, **38**, 1077 (1991).
- 33.- C.R. Linders, G.J. Patriarche, J.M. Kauffmann y G.G. Guilbault, *Anal. Lett.*, **19**, 193 (1986).
- 34.- C.R. Linders, J. M. Kauffmann y G.J. Patriarche, *J. Pharm. Belg.*, **41**, 373 (1986).
- 35.- E.G. Cookeas, C.E. Efstathiou, *Analyst*, **119**, 1607 (1994).
- 36.- M.A. Ruiz, M.P. Calvo y J.M. Pingarrón, *Talanta*, **41**, 289 (1994).
- 37.- M.A. Ruiz, P. Yáñez-Sedeño y J.M. Pingarrón, *Electroanalysis*, **6**, 475 (1994).
- 38.- X. Qi y R.P. Baldwin, *Electroanalysis*, **5**, 547 (1993).
- 39.- Y. Xie y C.O. Huber, *Anal. Chem.*, **63**, 1714 (1991).
- 40.- J. Wang y Z. Taha, *Anal. Chem.*, **62**, 1413 (1990).
- 41.- S. Manino, M.S. Cosio y S. Ratti, *Electroanalysis*, **5**, 145 (1993).
- 42.- Q. Chen, J. Wang, G. Rayson, B. Tian y Y. Lin, *Anal. Chem.*, **65**, 251 (1993).
- 43.- H.Y. Cheng, E. Strobe y R.N. Adams, *Anal. Chem.*, **51**, 2243 (1979).
- 44.- R. Deshi, T.M. Cotton y R. Timkovich, *J. Electroanal. Chem.*, **154**, 129 (1983).
- 45.- K. Ravichandran y R.P. Baldwin, *Anal. Chem.*, **55**, 1586 (1983).
- 46.- R.P. Baldwin y K.N.Thomsen, *Talanta*, **38**, 1 (1991).
- 47.- E. Wang, H. Ji y W. Hou, *Electroanalysis*, **3**, (1991).
- 48.- P. Kissinger, J. Hart y R.N.Adams, *Brain Res.*, **55**, 209 (1973).
- 49.- J. Park y B.R. Shaw, *J. Electrochem. Soc.*, **141**, 323 (1994).
- 50.- C. Petit y J.M. Kauffmann, *Anal. Proc.*, **32**, 11 (1995).
- 51.- X. Huang y W.T. Kok, *Anal. Chim. Acta*, **273**, 245 (1993).

- 52.- S.A. Wring, J.P. Hart y B.J. Birch, *Analyst*, **114**, 1563 (1989).
- 53.- S.A. Wring, J.P. Hart y B.J. Birch, *Anal. Chim. Acta*, **229**, 63 (1990).
- 54.- X. Qi, R.P. Baldwin y T.F. Guarr, *Electroanalysis*, **3**, 119 (1991).
- 55.- L.N. Klatt, D.R. Connell y R.E. Adams, *Anal. Chem.*, **47**, 2470 (1975).
- 56.- M.H. Shah y I.L. Honigberg, *Anal. Letters*, **16**, 1149 (1983).
- 57.- J. Wang, A.J. Reviejo y L. Angnes, *Electroanalysis*, **5**, 575 (1993).
- 58.- J.E. Anderson, D.E. Tallman, D.J. Chesney y J.L. Anderson, *Anal. Chem.*, **50**, 1051 (1978).
- 59.- D.J. Chesney, J.L. Anderson, D.E. Weisshaar y D.E. Tallman, *Anal. Chim. Acta*, **124**, 321 (1981).
- 60.- J.L. Anderson y D.J. Chesney, *Anal. Chem.*, **52**, 2156 (1980).
- 61.- D.E. Weisshaar, D.E. Tallman y J.L. Anderson, *Anal. Chem.*, **53**, 1809 (1981).
- 62.- E. Primo y J.M. Carrasco en "*Química Agrícola II. Plaguicidas y Fitorreguladores*", ed. Alhambra, Madrid, 1980.
- 63.- Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (Panel Determination Dithiocarbamate Residues, Comm. Anal. Methods Residues Vet. Prod. Foodstuffs, Engl.), *Analyst*, **106**, 782 (1981).
- 64.- E.N. Petersen, *Acta Psychiatr. Scand. Suppl.*, **369**, 7 (1992).
- 65.- W.J. Davidson y A. Wilson, *J. Stud. Alcohol*, **40**, 1073 (1979).
- 66.- R.R. Fysh y L.V. Jones, *Forensic Toxicol., Proc. Eur. Meet. Int. Assoc. Forensic Toxicol.*, 189 (1979).
- 67.- F. Friedli y B. Zimmerli, *Mitt. Geb. Lebensmittelunters. Hyg.*, **73**, 357 (1982).
- 68.- T. Yamazaki, T. Inoue, T. Yamada y A. Tanimura, *Food Addit. Contam.*, **3**, 145 (1986).
- 69.- P. Maini y R. Boni, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **37**, 931 (1986).
- 70.- J. Yao, Y. Zheng, S. Jiao, Z. Wang y F. Zhao, *Zhongguo Nongye Kexue (Beijing)*, **22**, 76 (1989).
- 71.- E. Katsura, H. Ogawa, A. Kanetoshi y H. Kaneshima, *Hokkaidoritsu Eisei Kenkyushoho*, **40**, 83 (1990).
- 72.- J.C. Jensen y M.D. Faiman, *J. Chromatogr*, **181**, 407 (1980).

- 73.- S.B. Pedersen, *Arch. Pharm. Chemi, Sci. Ed.*, **8**, 65 (1980).
- 74.- W. Kamutzki y T. Krause, *Papier (Darmstadt)*, **34**, V29 (1980).
- 75.- K.H. Gustafsson y R.A. Thompson, *J. Agric. Food Chem.*, **29**, 729 (1981).
- 76.- C.E. Werkhoven-Goewie, W.M.A. Niessen, U.A.T. Brinkman y R.W. Frei, *J. Chromatogr*, **203**, 165 (1981).
- 77.- R.M. Smith, R.L. Morarji y W.G. Salt, *Analyst (London)*, **106**, 129 (1981).
- 78.- P.D. Masso y P.A. Kramer, *J. Chromatogr*, **224**, 457 (1981).
- 79.- K.H. Gustafsson y C.H. Fahlgren, *J. Agric. Food Chem.*, **31**, 461 (1983).
- 80.- M. Meloni, F.M. Pirisi, P. Cabras y F. Cabitza, *J. Agric. Food Chem.*, **32**, 183 (1984).
- 81.- B. Johannson, *J. Chromatogr.*, **378**, 419 (1986).
- 82.- E. Brandsteterova, J. Lehotay, O. Liska y J. Garaj, *J. Chromatogr.*, **354**, 375 (1986).
- 83.- H. Irth, G.J. De Jong, U.A.T. Brinkman y R.W. Frei, *J. Chromatogr.*, **370**, 439 (1986).
- 84.- H.G. Eigendorf, *pharmazie*, **43**, 287 (1988).
- 85.- H. Irth, G.J. De Jong, U.A.T. Brinkman y R.W. Frei, *J. Chromatogr.*, **424**, 95 (1988).
- 86.- C.J. Miles y H.A. Moye, *Anal. Chem.*, **60**, 220 (1988).
- 87.- B. Johannson, *Clin. Chim. Acta*, **177**, 55 (1988).
- 88.- C. Sanchez-Brunete, A. De Cal, P. Melgarejo y J.L. Tadeo, *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, **37**, 35 (1989).
- 89.- H. Irth, G.J. De Jong, R.W. Frei y U.A.T. Brinkman, *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, **39**, 129 (1990).
- 90.- M. Rodero, M.T. Sevilla y L. Hernandez, *Microchem. J.*, **41**, 22 (1990).
- 91.- C.J. Miles y M. Zhou, *J. Agric. Food Chem.*, **38**, 986 (1990).
- 92.- M. Bounoshita, *Jasco Rep.*, **33**, 7 (1991).
- 93.- R.A. Baumann, E. Dijkman, E.A. Hogendoorn y P. Van Zoonen, *Meded. Fac. Landbouwwet., Rijksuniv. Gent*, **56**, 941 (1991).
- 94.- E.Y. Kozlova y V.N. Kobrina, *Sib. Khim. Zh.*, **2**, 29 (1992).

- 95.- K. Matsui, S. Siode y Y. Moriguchi, *Osaka-shi Suidokyoku Suishitsu Shikensho Chosa Kenkyu Narabini Shiken Seiseki*, **42**, 113 (1991).
- 96.- N. Ikeda, S. Ito y M. Sasaki, *Kankyo Kagaku*, **2**, 581 (1992).
- 97.- E. Katsura, H. Ogawa, A. Kanetoshi y H. Kaneshima, *Hokkaido Koshu Eiseigaku Zasshi*, **4**, 72 (1991).
- 98.- K. Nazuyoshi y Y. Komura, *Chiba-ken Eisei Kenkyusho Kenkyu Hokoku*, **15**, 59 (1991).
- 99.- N. Yamada, B. Tomita y K. Chaya, *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, **38**, 566 (1992).
- 100.- Y. Kato, J. Takahata, Y. Takahashi y T. Seki, *Sendai-shi Eisei Kenkyushoho*, **21**, 265 (1992).
- 101.- K. Matsui, S. Shioide y Y. Moriguchi, *Osaka-shi Suidokyoku Suishitsu Shikensho Chosa Kenkyu Narabini Shiken Seiseki*, **43**, 116 (1992).
- 102.- N. Ikeda, S. Itou y M.Sasaki, *Nara-ken Eisei Kenkyusho Menpo*, **26**, 97 (1992).
- 103.- I. Liska, E.R. Brouwer, A.G.L. Ostheimer, H. Lingeman, U.A.T. Brinkman, R.B. Geerdink y W.H. Mulder, *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, **47**, 267 (1992).
- 104.- L. Roland, N. Gocha, L. Lenoir, M. Frennet y P. Hacourt, *Meded. Fac. Landbouwwet., Univ. Gent*, **57**, 1255 (1992).
- 105.- J. Saimatsu, T. Hasegawa, A. Matsuo, K. Koida, Y. Yano, Y. Kohno y Y. Tsue, *Hiroshima-shi Eisei Kenkyusho Nenpo*, **11**, 35 (1992).
- 106.- M. Kato, H. Tsukabayashi, S. Hori, T. Hashida, H. Hashiba y T. Namiki, *Ishikawa-Ken Eisei Kenkyusho Nenpo*, **29**, 317 (1993).
- 107.- T. Nakamura, K. Takashima, J. Yoshimi, A. Okazaki y S. Tosa, *Tokushima-ken Hoken Kankyo Senta Nenpo*, **10**, 87 (1993)
- 108.- T. Suzuki, K. Yaguchi y I. Kano, *J. Chromatogr.*, **643**, 173 (1993).
- 109.- M. Ohto, A. Yamamoto, A. Matsunaga y E. Mizukami, *Bunseki Kagaku*, **43**, 71 (1994).
- 110.- C. Fujimoto, *Chiba-ken Suishitsu Hozen Kenkyusho Nenpo*, 141 (1993).
- 111.- Y. Pan, H. Takagi y C. Chen, *Sepu*, **11**, 302 (1993).

- 112.- M. Kato, H. Tsukabayashi, S. Hori, F. Watanugi, T. Namiki y Y. Minami, *Ishikawa-ken Hoken Kankyo Senta Nenpo*, **30**, 271 (1994).
- 113.- E. B. Muzhanovskii, A.F. Fartushnyi, A.L. Sedov y S.G. Beikin, *Farm. Zh. (Kiev)*, **2**, 54 (1979).
- 114.- S.N. Tewari y R. Singh, *Fresenius' Z. Anal. Chem.*, **294**, 287 (1979).
- 115.- R.I. Rozvaga, L.A. Mel'nichenko, *Zavod. Lab.*, **46**, 111 (1980).
- 116.- G.G. Volkova y L.A. Rogova, *Khim. Prom-st., Ser.: Metody Anal. Kontrolya Kach. Prod. Khim. Prom-sti*, **8**, 17 (1981).
- 117.- L.I. Kozyura y L.A. Sukhanova, *Otkrytiya, Izobret., Prom. Obraztsy, Tovarnye Znaki*, **46**, 206 (1982).
- 118.- M. Murawska, *Zesz. Probl. Postepow Nauk Roln.*, **319**, 315 (1986).
- 119.- N. Y. Grushevskaya y N.F. Kazarinova, *Zh. Anal. Khim.*, **42**, 164 (1987).
- 120.- Z. Kubiak y T. Fortuna, *Farm. Pol.*, **43**, 79 (1987).
- 121.- J. Maslowska y A. Owczarek, *Przem. Chem*, **69**, 74 (1990).
- 122.- S. Wakida, S. Takeda, M. Yamane, A. Kawahara y K. Higashi, *Anal. Sci.*, **7**, 1109 (1991).
- 123.- Z. Chmiel, *Chem. Anal (Warsaw)*, **24**, 505 (1979).
- 124.- Instituto Superiore di Sanita, *Boll. Chim. Unione Ital. Lab. Prov., Parte Sci.*, **6**, 619 (1980).
- 125.- O.V. Lukashevich y T.F. Blinova, *Zashch. Rast. (Moscow)*, **2**, 55 (1981).
- 126.- E.J. Wojtowicz, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **64**, 554 (1981).
- 127.- M. Skrdlik y V. Marek, *Prac. Lek.*, **33**, 86 (1981).
- 128.- T.A. Pressley y J.E. Longbottom, *Gov. Rep. Announce. Index*, **82**, 1544 (1982).
- 129.- F. Kusano y H. Kawasaki, *Bunseki Kagaku*, **31**, 583 (1982).
- 130.- B.C. Verma, R.K. Sood y H.S. Sidhu, *Talanta*, **30**, 787 (1983).
- 131.- J. Piechocka, *Rocz. Panstw. Zakl. Hig.*, **35**, 83 (1984).
- 132.- B.C. Verma, R.K. Sood, D.K. Sharma, H.S. Sidhu y S. Chauhan, *Analyst*, **109**, 649 (1984).
- 133.- M. Bubicz, G. Macik-Baranska y A. Niewiadomy, *Chem. Anal. (Warsaw)*, **29**,

- 497 (1984).
- 134.- C.S.P. Sastry , P. Satyanarayana, A. Rao, M. Rama N.R. Singh, *J. Food Sci. Technol.*, **25**, 377 (1988).
- 135.- B.C. Verma, V.S. Jamwal, P.Kumar, S. Kumar y J.M. Butail, *Natl. Acad. Sci. Lett.*, **12**, 303 (1989).
- 136.- A.K. Malik y A.L.J. Rao, *Talanta*, **37**, 1205 (1990).
- 137.- A.L.J. Rao y A.K. Malik, *J. Indian Chem. Soc.*, **67**, 615 (1990).
- 138.- A.K. Malik y A.L.J. Rao, *J. Inst. Chem.*, **62**, 184 (1990).
- 139.- K.S. Zainutdinov, T.K. Vergeichik y L.T. Ikramov, *Sud.-Med. Ekspert.*, **33**, 27 (1990).
- 140.- A.L.J. Rao y N. Verma, *J. Indian Chem. Soc.*, **67**, 1006 (1990).
- 141.- A.K. Malik, Y. Paul, A.J.L. Rao y B.K. Puri, *Int. J. Environ. Stud.*, **38**, 199 (1991).
- 142.- A.K. Malik y A.L.J. Rao, *Indian J. Chem., Sect. A: Inorg., Bio-inorg., Phys., Theor. Anal. Chem.*, **30**, 986 (1991).
- 143.- J. Vuik, R. Van Dinter y R.H. De Vos, *J. Agric. Food Chem.*, **40**, 604 (1992).
- 144.- G. Xuan, Z. Quan, Z. Song y H. Piao, *Yanbian Yixueyuan Xuebao*, **15**, 173 (1992).
- 145.- W. Schwack y S. Nyanzi, *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **345**, 705 (1993).
- 146.- A.K. Malik, Y. Paul y A.L.J. Rao, *Indian J. Environ. Health*, **34**, 39 (1992).
- 147.- M.L. Lunar, S. Rubio y D. Perez-Bendito, *Anal. Chim. Acta*, **286**, 233 (1994).
- 148.- W. Schwack y S. Nyanzi, *Z. Lebensm.-Unters. Forsch*, **198**, 3 (1994).
- 149.- J.L. Martinez-Vidal, D. Cervantes-Ocaña, A.R. Fernandez-Alba y P. Aguilera-Aguera, *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, **56**, 1 (1994).
- 150.- J.L. Vandenbalck, J.C. Vire, C.A. Mairesse-Ducarmois y G.J. Patriarche, *Analisis*, **7**, 88 (1979)
- 151.- L.S. Anisimova y V.E. Katyukhin, *Zh. Anal. Khim.*, **38**, 106 (1983).
- 152.- A.V. Mikhailov y N.V. Zaitseva, *Otkrytiya, Izobret., Prom. Obraztsy, Tovarnye Znaki*, **1**, 172 (1984).

- 153.- J. Rodriguez, M.T. Sevilla y L. Hernandez, *Fresenius Z. Anal. Chem.*, **311**, 27 (1988).
- 154.- M.S. Goizman, N.B. Grigor'ev, I.P. Ivanova, *Khim.-Farm. Zh.*, **25**, 77 (1991).
- 155.- W. Schwack, B. Bruger y S. Nyanzi, *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **351**, 297 (1995).
- 156.- Z. Kubiak y D. Wasiak-Wisniewska, *Organika*, 125 (1979).
- 157.- V.L. Strigina y A.E. Gudkova, *Zavod. Lab.*, **46**, 596 (1980).
- 158.- D.K. Basu, B. Adhikari, D. Pal y A.K. Chaudhuri, *Talanta*, **28**, 262 (1981).
- 159.- B.C. Verma, H.S. Sidhu y R.K. Sood, *Talanta*, **29**, 703 (1982).
- 160.- E. Curea, M. Botija y L. Boleta, *Clujul Med.*, **55**, 136 (1982).
- 161.- D.D. Clyde, *J. Assoc. off. Anal. Chem.*, **66**, 646 (1983).
- 162.- B.C. Verma, R.K. Sood y H.S. Sidhu, *Indian J. Agric. Sci.*, **54**, 123 (1984).
- 163.- B.C. Verma, H.S. Sidhu y R.K. Sood, *Proc. Indian Natl. Sci. Acad., Part A*, **50**, 229 (1984).
- 164.- B.C. Verma, U. Sharma, A. Sood, D.K. Sharma y R.K. Sood, *Zh. Anal. Khim.*, **42**, 1330 (1987).
- 165.- A.I. Sichko y L.G. Nikonova, *Farmatsiya (Moscow)*, **38**, 62 (1989).
- 166.- Z. Kurzawa, K. Janowicz y J. Kurzawa, *Anal. Chim. Acta*, **243**, 201 (1991).
- 167.- J.H. Zagal y C. Paez, *Electrochim. Acta*, **34**, 243 (1989).
- 168.- S.A. Wring, J. P. Hart y B.J. Birch, *Electroanalysis*, **4**, 299 (1992).
- 169.- R.S. Nicholson y I. Shain, *Anal. Chem.*, **36**, 706 (1964).
- 170.- A.M. Bond en "*Modern Polarographic Methods in Analytical Chemistry*". Marcel Dekker, New York, 1980, p.194.
- 171.- ACS Committee on environmental improvement, principles of environmental analysis, *Anal. Chem.*, **55**, 2210 (1983).
- 172.- K. Hasebe y J. Osteryoung, *Anal. Chem.*, **47**, 2412 (1975).
- 173.- N. Gocha y P. Creemers, *Meded. Fac. Landbouwwet, Rijksuniv. Gent*, **56**, 501 (1991).
- 174.- D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, S.N. Deming, Y. Michottey L. Kaufman en "*Chemometrics: A Textbook*". Elsevier, Amsterdam, 1988, cap. 26.

- 175.- H. Martens y T. Naes en "*Multivariate Calibration*". John Wiley and Sons, Chichester, United Kingdom, 1989, cap. 2-5.
- 176.- H. Martens, T. Karstang y T. Naes, *J. Chemometrics*, **1**, 201 (1987).
- 177.- C.W. Brown, P.F. Lynch, R.J. Obremski y D. S. Lavery, *Anal. Chem.*, **54**, 1472 (1982).
- 178.- M. Otto y W. Wegscheider, *Anal. Chem.*, **57**, 63 (1985).
- 179.- M. Sjöström, S. Wold, W. Lindberg, J.A. Persson y H. Martens, *Anal. Chim. Acta*, **150**, 61 (1983).
- 180.- W. Lindberg, J.A. Persson y S. Wold, *Anal. Chem.*, **55**, 643 (1983).
- 181.- I.E. Frank, J.H. Kalivas y B.R. Kowalski, *Anal. Chem.*, **55**, 1800 (1983).
- 182.- J. Öhman, W. Lindberg y S. Wold, *Anal. Chem.*, **60**, 2756 (1988).
- 183.- W. Lindberg, G.D. Clark, J.P. Hanna, D.A. Whitman, G.D. Christian y J. Rusicka, *Anal. Chem.*, **62**, 849 (1990).
- 184.- H. Martens en "*Multivariate Calibration: Quantitative Interpretation of Non-selective Chemical Data*", The Norwegian Institute of Technology, University of Trondheim, Noruega, 1985.
- 185.- P. Hoskuldsson, *J. Chemometrics*, **2**, 211 (1988).
- 186.- J. Zupan y J. Gasteiger, *Anal. Chim. Acta*, **248**, 1 (1991).
- 187.- D.E. Rumelhart y J.L. McClelland en "*Parallel Distributed Processing*", Vols. 1 y 2, MIT Press, Bradford, 1986.
- 188.- R.P. Lippmann, *IEEE ASSM Magazine*, Abril (1987), 4.
- 189.- P.D. Wasserman y T. Schwarz, *IEEE Expert*, Winter (1987) 10; Spring (1988) 10.
- 190.- T. Kohonen en "*Self-Organization and Associative Memory*", Springer, Berlin, 2nd edn., 1988.
- 191.- W.P. Jones, "Back-Propagation", *Byte*, Octubre (1987) 155.
- 192.- N.J. Nilsson en "*Learning Machines*", McGraw-Hill, New York, 1965.
- 193.- T.L. Isenhour, B.R. Kowalski y P.C. Jurs, *CRC Crit. Rev. Anal. Chem.*, (1974) 1.
- 194.- M. Bos y G. Jasink, *Anal Chim. Acta*, **103** (1978) 151.

- 195.- W.S. McCulloch y W. Pitts, *Bull. Math. Biophys.*, **5**, 115 (1943).
- 196.- J.J. Hopfield, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **79**, 2554 (1982).
- 197.- M. Bos, A. Bos y W.E. Van der Linden, *Anal. Chim. Acta*, **233**, 31 (1990).
- 198.- E. Laviron, L. Roullier y C. Degrand, *J. Electroanal. Chem.*, **112**, 12 (1980).
- 199.- A.J. Bard y L.R. Faulkner en " *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*", Wiley, New York, 1980, cap. 12.
- 200.- J. Wang y B.A. Freiha, *Anal. Chem.*, **55**, 1285 (1983).