

1. INTRODUCCIÓN

1.1. PROCESOS DE DEGRADACIÓN

Una vez dispersados en el medio, los plaguicidas sufren alteraciones en su estructura debido a procesos tanto abióticos como bióticos. Los procesos de transformación dependen, entre otros factores, del “compartimento” medioambiental en el cual los compuestos son dispersados y transportados. Los plaguicidas pueden permanecer en cualquiera de los tres “compartimentos”: aire, tierra y agua, y su distribución depende de sus propiedades físico-químicas. Conociendo la presión de vapor, solubilidad en agua, absorción y desorción, se puede predecir donde se encontrarán con mayor probabilidad.

Los procesos de transformación están influidos por distintos factores como la temperatura, la intensidad y duración de la luz solar, el pH o la composición del agua. En principio, y bajo condiciones favorables, la degradación tiene lugar hasta la mineralización completa del pesticida, dando como productos finales CO_2 , H_2O , NH_4^+ , NO_3^- , SO_4^{2-} , etc., dependiendo de cada pesticida en particular. Pero en muchas ocasiones, esta transformación total no ocurre, y el pesticida es degradado a otros productos cuya toxicidad, movilidad y efectos sobre el medio son prácticamente desconocidos, aunque en muchos casos se trata de compuestos más tóxicos y persistentes que los productos de partida.

Por lo tanto, es necesario llevar a cabo estudios de laboratorio sobre la degradación de pesticidas en el medio ambiente, para obtener información sobre sus principales vías de transformación en condiciones naturales, así como estudios para determinar la toxicidad de los productos de transformación.

En sistemas acuosos los procesos abióticos de degradación principales son la degradación química y la fotodegradación.

Las reacciones de degradación química más importantes son las de hidrólisis, que puede tener lugar en condiciones tanto ácidas como básicas. Los organofosforados, carbamatos, triazinas y hidrocarburos clorados se degradan mediante este tipo de reacciones, que pueden ser aceleradas por la presencia de minerales o de óxidos metálicos [1]. En cambio, la adsorción de los pesticidas en la materia orgánica, puede llegar a impedir su degradación [2]. En la mayoría de los casos son distintos los mecanismos que contribuyen al proceso de degradación [3], que presenta una fuerte dependencia con el pH. Dado que el pH en aguas naturales oscila entre 5 y 9, la hidrólisis es un proceso de menor importancia en aguas superficiales, aunque puede ser una

importante vía de degradación de pesticidas en aguas subterráneas, donde la fotodegradación prácticamente no tiene lugar.

Con respecto a la fotodegradación podemos considerar dos efectos diferentes: la fotólisis directa y la fotólisis indirecta.

La fotólisis directa comprende la absorción directa de la luz por el plaguicida seguido de la reacción química correspondiente, sin ninguna colaboración de otras sustancias químicas. Este proceso viene condicionado por variables ambientales como la radiación solar en la superficie del agua o su transmisión a través del agua, y por factores intrínsecos de la sustancia como son la velocidad de absorción de la luz y el rendimiento cuántico de la reacción fotoquímica [4]. El rendimiento cuántico viene dado por la relación entre el número de moléculas que reaccionan y el número de fotones absorbidos, y es un parámetro muy útil para conocer la importancia relativa de la fotólisis directa bajo unas condiciones ambientales determinadas y donde otros procesos de degradación como la hidrólisis pueden competir.

En los procesos de fotólisis indirecta, la energía de la luz es absorbida por otros constituyentes del agua y es o bien transmitida a un plaguicida cercano o permite la formación de especies reactivas como radicales hidroxilo, que reaccionan con el plaguicida y lo transforman. Los procesos de degradación bajo fotólisis indirecta tienen una gran importancia en la transformación total del compuesto [5]. Especies orgánicas como los ácidos húmicos y fúlvicos e inorgánicas como nitratos y nitritos pueden acelerar considerablemente la fotodegradación del pesticida [6-9], pero también se ha observado el efecto contrario utilizando agua de mar o determinados compuestos orgánicos [10,11].

Existen numerosos estudios de fotodegradación realizados en condiciones de laboratorio y utilizando diferentes tipos de plaguicidas: carbamatos [12-14], triazinas [10,12,15], organofosforados [10,12,16], fenilureas [10,12,17], etc.

Las principales discrepancias en datos sobre fotólisis de pesticidas (tiempo de vida media, constante de velocidad, etc.) provienen de la diversidad en los sistemas acuosos y las fuentes de irradiación utilizadas (luz solar, lámpara de arco de xenón ó lámpara de mercurio).

La velocidad de fotólisis y la distribución de los fotoproductos son dependientes de la intensidad y distribución de la longitud de onda de la luz usada. En nuestro caso se utilizó una lámpara de arco de xenón (Xn) ya que proporciona longitudes de onda cercanas a las del espectro de la luz solar, y teóricamente pueden originarse productos de degradación similares a los

obtenidos mediante irradiación solar. Las velocidades de fotólisis con lámparas artificiales siempre son mayores que las obtenidas utilizando luz solar, tal y como se ha comprobado tanto en este trabajo como en trabajos anteriores [18-20]. En la gráfica 1 se muestra el espectro solar medido en Almería (37° latitud norte) durante el verano con un espectroradiómetro OMAII multicanal [21], y el espectro proporcionado por la lámpara de Xn.

Gráfica 1. Comparación del espectro de irradiación de a) lámpara de arco de Xn, y b) luz solar medida en Almería entre 286 y 400 nm.

Generalmente, los estudios de fotodegradación se realizan con altas concentraciones de pesticidas (entre 0,2 y 1 ppm) con el fin de identificar la mayor cantidad posible de productos de degradación. Sin embargo, las altas concentraciones pueden ser responsables de la formación de dímeros fotoquímicamente inducidos. Además, al utilizar altas concentraciones también se tienen que adicionar disolventes orgánicos como el acetonitrilo y el metanol para incrementar la solubilidad del pesticida en agua (generalmente entre un 2% y un 5%), lo cual puede variar el comportamiento del pesticida con respecto a un medio acuoso natural. Para evitar estos dos problemas, los estudios realizados en este trabajo se hicieron a partir de disoluciones de 50 ppb, concentraciones cercanas a los niveles ambientales, y que nos aproximan con bastante exactitud a las condiciones ambientales reales.

1.2. CINÉTICA DE DEGRADACIÓN. ECUACIÓN DE VELOCIDAD

Las reacciones de degradación de los pesticidas en aguas naturales pueden seguir cinéticas de distintos órdenes. Pero, de forma general, se pueden describir como reacciones de primer orden. En estos casos, la representación gráfica del logaritmo de las concentraciones en función del tiempo da una recta, cuya pendiente se puede relacionar con la constante de degradación (k) y ésta, con el tiempo de vida media ($t_{1/2}$) que indica la estabilidad del compuesto a través del tiempo, según las ecuaciones [22,23]:

$$-(\ln[C_0] - \ln[C]) = kt \quad (1)$$

y

$$t_{1/2} = 0.693/k \quad (2)$$

En suelos y acuíferos, los pesticidas pueden reaccionar químicamente. En presencia de agua u oxígeno, se pueden hidrolizar, oxidar o formar isómeros. Pero además, en aguas superficiales esta degradación puede ser acelerada mediante la fotólisis.

Las reacciones de fotólisis que tienen interés en el medio ambiente son las producidas por la radiación solar, y para que ello ocurra es necesario que el compuesto químico absorba la longitud de onda de la radiación solar, por encima de 290 nm.

La velocidad de fotólisis es función de los fotones absorbidos de una determinada longitud de onda [4], y está dada por la ecuación:

$$v_f = I_a \cdot \phi_f \quad (3)$$

donde:

:

- I_a es la intensidad de luz absorbida por el sistema en una determinada longitud de onda.
- ϕ_f es el rendimiento cuántico de la reacción fotoquímica.

La intensidad de luz absorbida depende del coeficiente de absortividad molar (ϵ) y de la concentración del compuesto químico [C]:

$$I_a = I_0 (1 - 10^{-\epsilon C l}) \quad (4)$$

donde l es la distancia recorrida por la radiación en la columna de agua para alcanzar el compuesto químico y I_0 es la intensidad de luz incidente. Por tanto, la velocidad de fotólisis en función de la longitud de onda λ viene dada por:

$$k_{\lambda} = I_0 (1 - 10^{-\epsilon C l})^{\lambda} \quad (5)$$

La velocidad total de fotólisis directa se obtiene integrando en el intervalo de λ en el cual absorbe el compuesto químico:

$$d[C]/dt = -k_{\lambda}[C] \quad (6)$$

En aguas naturales, además de la reacción de fotólisis, se llevan a cabo fotodegradaciones sensibilizadas debido a la presencia de compuestos o iones naturales, tales como nitratos, nitritos, ácidos húmicos, etc., que aceleran la degradación del compuesto. Por esta razón la determinación de la velocidad de fotólisis directa de un compuesto se suele realizar en agua desionizada, tal como se hizo en el presente trabajo.

En las fotodegradaciones con luz solar, la comparación del tiempo de vida media con otros valores indicados en la literatura se debe hacer con cautela, ya que, como hemos comentado, varía con la estación del año, la hora, la latitud, etc. En las fotodegradaciones con lámpara de xenón, la comparación de los tiempos de vida media se puede hacer más fácilmente y de una manera estandarizada.

1.3 TÉCNICAS ANALÍTICAS

Las técnicas analíticas más utilizadas en estudios de degradación son la GC [24,25] y el HPLC [26,27]. Ambas técnicas han sido usadas tanto para realizar estudios cinéticos de degradación como para identificar los productos de degradación.

Utilizando la Electroforesis Capilar existen pocas referencias bibliográficas relacionadas con estudios de degradación de plaguicidas [28] debido, probablemente, a que es una técnica relativamente nueva y a que su sensibilidad no es tan buena como la obtenida mediante GC. Las ventajas con respecto a HPLC y GC ya se discutieron en el capítulo 2, donde también se demostró la viabilidad de MECC para el análisis de herbicidas fenoxiácidos y fenilureicos. En el capítulo 4 se dio una solución a la falta de sensibilidad de MECC, y se demostró que utilizando columnas de extracción en fase sólida (SPE) de tipo Carbo-pack se podían obtener límites de detección inferiores a 0.1 ppb. Todos estos resultados nos sugieren que el sistema MECC-SPE puede ser utilizado en el estudio de degradación de herbicidas fenoxiácidos y fenilureicos que se pretende realizar.

Otro problema importante en el planteamiento del estudio es la detección de los productos de degradación. Por una parte, se desconoce si con las técnicas analíticas y con las condiciones experimentales utilizadas se podrán detectar los principales productos de degradación de los herbicidas estudiados. Por otra parte, no se posee el sistema de detección adecuado como para poder deducir la composición de los productos de degradación detectados. Para ello se necesitaría un espectrómetro de masas acoplado al aparato de electroforesis capilar.

Teniendo en cuenta estas dos limitaciones en la instrumentación analítica utilizada, el estudio se planteó presuponiendo los posibles productos de degradación, adaptando el sistema analítico a estos compuestos, y confirmando su presencia mediante los correspondientes patrones.

Los compuestos principales derivados de la degradación de los herbicidas que se están utilizando son los resultantes de su dechloración, hidroxilación o de la rotura de la molécula formando anilinas en el caso de las fenilureas ó fenoles en el caso de los fenoxiácidos [10,12,28,36,37,40]. La elección de los productos de degradación que se pretenden detectar en el estudio se realizó teniendo en cuenta estas vías de degradación, y son los siguientes:

- 2,4-diclorofenol (derivado del 2,4-DP).
- 2,4,5-triclorofenol (derivado del 2,4,5-T).
- 4-cloronilina (derivado del Monolinurón).

- 3,4-dicloroanilina (derivado del Diurón).
- Fenurón (derivado del Diurón).
- Monurón (derivado del Diurón).

Para otros compuestos, como los resultantes de la dechloración del monolinurón, 2,4-DP ó 2,4,5-T, podemos suponer su presencia pero no confirmarla debido a la falta de patrones de referencia.

El desarrollo de los métodos de análisis para estos compuestos se describe en el apartado 2.2, y confirman la viabilidad del sistema de análisis utilizado para su detección y cuantificación.

1.4 ESTUDIO DE TOXICIDAD

Uno de los factores más importantes para evaluar la capacidad contaminante de un compuesto es su degradabilidad. Desde el punto de vista de protección de aguas naturales, es importante que los pesticidas se degraden de forma rápida y cuantitativa. En la mayoría de los casos, las reacciones de degradación transforman los pesticidas en otros compuestos de menor toxicidad, aunque en otros casos, los productos de degradación son tanto o más tóxicos que los propios pesticidas. Por otra parte, los compuestos químicos se presentan normalmente en el medio ambiente como mezclas de composición desconocida, de forma que sus efectos tóxicos pueden ser aditivos, antagonísticos o sinérgicos.

Para evaluar la toxicidad de una muestra existen dos tipos de metodologías principales: las relaciones cuantitativas estructura – toxicidad (QSTR) y los bioensayos [29].

Las técnicas QSTR son métodos que, utilizando ecuaciones matemáticas, predicen la toxicidad de compuestos basándose en variables estructurales.

Los bioensayos son técnicas de laboratorio para evaluar experimentalmente la toxicidad de una muestra, determinando la respuesta biológica de organismos de prueba expuestos a ella. Cuando los organismos de prueba son peces o mamíferos, la duración y la complejidad experimental hace prácticamente imposible la evaluación de un elevado número de compuestos en un tiempo y a un costo razonables. Por ejemplo, para un test de toxicidad acuática con peces se precisan un mínimo de 50 individuos de la misma especie, edad y tamaño, criados bajo las mismas condiciones, en 10 acuarios distintos, con un volumen de agua suficiente y el test tiene una duración mínima de 96 horas.

Por este motivo, se han desarrollado tests de toxicidad utilizando microorganismos, en los que se puede valorar la respuesta de una población numerosa de bacterias (millones) de forma rápida (30 minutos), sencilla y de bajo coste. Uno de los más utilizados es el analizador de toxicidad Microtox que utiliza como organismo de prueba una bacteria marina luminiscente y no patógena de la especie *Photobacterium Phosphoreum*. Estas bacterias emiten luz como mecanismo de liberación de energía en el curso de su metabolismo normal. La intensidad de luz emitida es, por tanto, una medida de la actividad metabólica de las bacterias. Cuando se exponen a una muestra tóxica, la emisión de luz disminuye de forma proporcional a la toxicidad de la muestra.

El bioensayo Microtox está siendo usado intensivamente por diferentes sectores industriales para determinar la conveniencia del vertido directo de aguas residuales o residuos sólidos, o la eficiencia del tratamiento de sus residuos. Además de estas determinaciones directas de toxicidad de efluentes, también se ha utilizado en la detección de focos de contaminación, en operaciones de vigilancia de cuencas hidrográficas y en el examen de aguas subterráneas potencialmente contaminadas. Por otra parte, ha sido recomendado por distintos organismos oficiales para evaluar la toxicidad de compuestos químicos, aguas residuales o residuos sólidos.

En los últimos años, han aparecido publicaciones en las que se utilizaba esta técnica para evaluar la toxicidad de distintos pesticidas [30-37] y para determinar interacciones cruzadas [38].

En este contexto, en el presente estudio se han realizado una serie de ensayos Microtox para evaluar la toxicidad de los pesticidas estudiados, tanto de forma individual como en mezclas, y la de sus productos de degradación.

1.5 OBJETIVOS

Los objetivos principales del presente trabajo son los siguientes:

- La aplicación de la técnica de análisis MECC y las columnas de extracción en fase sólida “Carbopack” a estudios de degradación de herbicidas fenoxiácidos y fenilureicos.
- El estudio de la cinética de degradación de estos herbicidas bajo diversas condiciones ambientales.
- La identificación de los principales productos de degradación.
- La evaluación del nivel de toxicidad tanto del herbicida original como de sus productos de degradación.

2. CONDICIONES EXPERIMENTALES

2.1. DISEÑO DE EXPERIMENTOS

Tal y como se ha explicado, la degradación de los plaguicidas en medios acuosos viene condicionada por una serie de fenómenos de origen físico, químico y biológico, como son las reacciones de hidrólisis, redox, fotólisis, degradación microbiana, la volatilización o la absorción.

En el estudio realizado se han tenido en cuenta dos vías de degradación: la fotodegradación y la degradación debida a la hidrólisis, diseñándose en el laboratorio una serie de experimentos que pueden simular las condiciones ambientales reales.

Con respecto a la fotodegradación se realizaron experimentos utilizando luz solar y luz artificial. Otro factor que influye en los procesos de fotólisis, además de la luz aplicada, es la presencia de compuestos fotosensibilizadores naturales o artificiales en el medio acuoso donde están disueltos los plaguicidas, tal como complejos de Fe^{+3} , complejos de Cu^{+2} , ácidos húmicos, etc. [6,7]. Estos compuestos suelen catalizar el proceso de fotólisis disminuyendo el tiempo de vida media. Para comprobar la influencia de este tipo de compuestos, los experimentos de fotodegradación se realizaron utilizando tanto agua potable como agua desionizada.

Con la luz solar, los tiempos de vida media de degradación de un compuesto pueden ser muy diferentes cuando se determinan en estaciones, días, u horas distintas, por ejemplo invierno vs verano, días nublados vs días soleados, al mediodía o por la mañana. También resulta difícil y complejo comparar los resultados de fotodegradaciones ambientales con luz solar en diferentes latitudes. En cambio los resultados con radiación artificial son muy reproducibles, y los tiempos de vida media obtenidos son menores que bajo la acción de la luz solar, ya que la radiación incidente sobre el recipiente de fotodegradación es constante. Los equipos diseñados para las fotodegradaciones no permiten la pérdida de radiación, tal como el aparato Suntest que tiene un filtro de borosilicato que emite una radiación constante por encima de 286 nm, y cuyas paredes interiores son láminas metálicas brillantes que enfocan la radiación hacia el recipiente de reacción [39]. El tiempo de vida media obtenido con la lámpara de xenón, a una potencia de radiación fijada por el usuario, se puede convertir mediante una operación matemática en el tiempo de vida media equivalente con la radiación solar [40].

Con respecto a los experimentos destinados a provocar la hidrólisis de los herbicidas se realizaron diversos ensayos, utilizando agua desionizada y agua potable, y con diferentes valores

de pH para acelerar el proceso de hidrólisis. Estas muestras se mantuvieron en la oscuridad con el fin de evitar posibles degradaciones por procesos de fotólisis.

Los herbicidas estudiados en todos los casos fueron Diurón, Monolinurón, 2,4-DP y 2,4,5-T.

2.1.1. Fotólisis artificial.

En un matraz aforado de 2 l se añadieron 2 ml de una disolución de 50 ppm de uno de los herbicidas en metanol. Se completó el matraz con agua desionizada o potable, consiguiendo una disolución de 50 ppb de cada uno de los cuatro herbicidas utilizados. El porcentaje de metanol en esta disolución fue de un 0.2%.

De esta disolución se separaron 200 ml para realizar un análisis inicial y 100 ml para realizar la prueba de toxicidad. El resto se pasó a un balón de cuarzo (transparente a la radiación ultravioleta), se mantuvo en irradiación con una lámpara de xenón y se fueron tomando muestras de 200 ml durante diferentes periodos de tiempo. La muestra de 200 ml se concentró mediante una columna Carboxpack B hasta un volumen final de 1 ml y una concentración teórica de 10 ppm. A continuación se analizó mediante MECC.

En total se tomaron 8 muestras de 200 ml durante un periodo de tiempo entre 20 y 40 horas, dependiendo de la velocidad de degradación del herbicida. Todas las muestras se analizaron conjuntamente y el estudio de degradación se realizó por duplicado. Se calcularon las correspondientes rectas de calibración de los herbicidas (tabla 1) entre 1 ppm y 12 ppm, y se calcularon los límites de detección para todo el procedimiento analítico utilizado, obteniéndose valores entre 2 y 5 ppb.

	ecuación de la recta	r ²
2,4-DP	y = -6.7+232.1x	0.9998
2,4,5-T	y = 98.2+421.6x	0.9999
Monolinurón	y = 292.4+412.1x	0.9989
Diurón	y = 906.6+877.1x	0.9993

Tabla 1. Ecuaciones de las rectas y valores de los coeficientes de regresión (r²) de los compuestos estudiados.

Antes de comenzar el estudio se realizaron ensayos previos de fotodegradación con una disolución de 10 ppm de los 4 herbicidas juntos. Estos resultados nos aproximaron el porcentaje de degradación de cada herbicida según el tiempo de exposición a la lámpara de Xn, dándonos la

información necesaria para planificar la duración de los experimentos y los intervalos de tiempo en los cuales realizar la toma de la muestra.

En los experimentos se usó agua desionizada (Milli-Q) y agua potable procedente de un pozo situado en el CID-CSIC. La composición de esta agua, según análisis realizados por los laboratorios de la depuradora de Aguas de Barcelona, es la siguiente:

Análisis	Resultado
pH	6,8
Nitratos	75 ppm
Sulfatos	387 ppm
Cloruros	183 ppm
Calcio	254 ppm
Magnesio	88 ppm
Conductividad	2.020 μ S/cm

Tabla 2. Composición del agua potable utilizada en los experimentos.

Las irradiaciones se realizaron con la luz solar y con el aparato Suntest de Heraeus (Hanau, Alemania) equipado con una lámpara de arco de xenón. El aparato Suntest tiene filtros ópticos no degradantes, instalados entre la fuente de luz y la superficie de la muestra, garantizando una radiación continua y constante en el intervalo de 300 a 800 nm durante 1500 horas [39]. El usuario tiene la opción de ajustar la potencia de la lámpara de xenón entre 400 y 765 W/m² en el intervalo de 300 a 800 nm. En este trabajo la potencia se ajustó a 550 W/m², cuyo valor está por debajo de la potencia promedio anual de la radiación solar que llega a la superficie de la tierra (636 W/m²).

2.1.2. Fotólisis solar.

El diseño de los experimentos fue similar al descrito en la fotodegradación con lámpara de Xn. En este caso la disolución que contenía los herbicidas se mantuvo durante dos meses (Mayo y Junio) en la terraza de la Escuela de Ingenieros Industriales, tomándose muestras semanalmente. Durante este tiempo las condiciones ambientales fueron muy diversas.

En este caso no se pudieron utilizar balones de cuarzo.

2.1.3. Hidrólisis.

Las condiciones experimentales fueron similares a los anteriores. Se realizaron ensayos con agua potable, agua destilada y con valores de pH de 5, 7 y 9 para acelerar el proceso de hidrólisis. Las disoluciones de los herbicidas, de 50 ppb de concentración, fueron mantenidas durante 6 meses en un lugar oscuro para evitar la fotólisis y se tomaron muestras mensualmente.

2.1.4. Toxicidad

Los experimentos se realizaron con distintas muestras de los cuatro herbicidas y de sus productos de degradación, tanto en forma individual o como mezclas (ver Tabla).

Nº de muestra	Herbicida
1	Monolinuron
2	Diuron
3	2,4-DP
4	2,4,5-T
5	Monolinuron + Diuron
6	2,4-DP + 2,4,5-T
7	Monolinuron (fotodegradado)
8	Diuron (fotodegradado)
9	2,4-DP (fotodegradado)
10	2,4,5-T (fotodegradado)
11	Monolinuron + Diuron (hidrolizado)

Tabla 3. Muestras analizadas en el estudio de toxicidad.

Las muestras iniciales (de la 1 a la 6) son las mismas disoluciones utilizadas para los experimentos de degradación. La concentración de herbicida en cada una es de 50 ppb en agua desionizada. El porcentaje de metanol es del 0.2% en las individuales, y del 0.4% en las mezclas binarias.

Las muestras fotodegradadas, cuya concentración inicial fue de 50 ppb, fueron irradiadas con la lámpara de Xn durante distintos tiempos, obtuyéndose degradaciones prácticamente cuantitativas:

Muestra	Tiempo de degradación (horas)	% degradación
7	26	95
8	18	100
9	28	99
10	28	98

Tabla 4. Porcentaje de herbicida degradado y tiempo expuesto a la lámpara de Xn de las muestras fotodegradadas utilizadas en el estudio de toxicidad.

La muestra destinada al estudio de hidrólisis (11), de concentración inicial de cada herbicida de 50 ppb en agua destilada, se ajustó a pH=7, y se mantuvo durante 6 meses en un lugar oscuro para evitar la fotólisis. El porcentaje de herbicida hidrolizado fue del 91% para el Monolinuron, y del 42% para el Diuron.

La toxicidad de cada una de estas muestras se analizó mediante el test Microtox. Los análisis fueron realizados con el sistema MICROTOX (modelo 500) de Microbics Corporation (Carlsbad, CA, USA) en la Escuela Politécnica Superior de la Universitat de Girona.

Las bacterias se suministran en forma liofilizada y se reconstituyen por re-hidratación con agua pura para preparar una suspensión de bacterias que se mantiene a 5°C. Se toman 5 alícuotas de esta suspensión para preparar 5 viales con igual cantidad de bacterias. Estos viales se mantienen a 15°C. Su emisión de luz se determina antes y después de la adición a cada uno de ellos del mismo volumen de muestra en 5 concentraciones distintas (entre el 5 y el 45% de la concentración inicial). Las lecturas de luz se efectúan a los 5, 15 y 30 minutos. A partir de la luz emitida, se calcula la función GAMMA (?) para cada muestra. Esta función es la relación entre la intensidad de luz perdida y la de la luz remanente y, en una escala logarítmica, sigue una relación lineal con la concentración de la muestra. La toxicidad se expresa como la concentración de muestra que reduce la intensidad de luz en un 50%, lo que equivale a $\gamma = 1$. Esta concentración se denomina concentración efectiva (EC50) y depende de la temperatura, el tiempo de exposición y la naturaleza química de los contaminantes en la muestra. Normalmente, la EC50 se expresa acompañada del tiempo de exposición, puesto que el ensayo se realiza siempre a 15°C.

En el caso de aguas naturales, puede resultar que la toxicidad no se manifieste debido a la dilución de los contaminantes. Aún en estos casos el ensayo Microtox puede utilizarse como ensayo comparativo de la toxicidad de varias muestras, utilizando el valor GAMMA en lugar de la EC50, siempre que las distintas respuestas hayan sido determinadas en soluciones de la muestra de idéntica concentración [41].

2.2. CONDICIONES DE ANALISIS

2.2.1. Concentración de la muestra.

Para concentrar las muestras antes de ser analizadas se utilizaron las columnas de carbón grafitizado "Carbopack B" descritas en el capítulo anterior. El procedimiento experimental empleado es el siguiente:

- a) Acondicionamiento de la columna mediante 5 ml de $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-H}_2\text{O}$ 80:20 + 2 ml de CH_3OH + 5 ml de HCl pH=2.
- b) Concentración de 200 ml de muestra de una concentración inicial de 50 ppb. Este volumen de muestra es forzado a pasar a través de la columna con un flujo de 20 ml/min. por medio de una bomba de vacío.
- c) Limpieza de la columna añadiendo 7 ml de agua desionizada.
- d) Secado de la columna centrifugándola durante 5 minutos a 2.000 r.p.m. y pasando nitrógeno a través de ella durante 2 minutos.
- e) Elución de los analitos mediante 2 ml de $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-CH}_3\text{OH}$ 60:40 + 0.016M de KOH . El eluyente pasa a través de la columna por su propia fuerza gravitatoria, sin utilizar la bomba de vacío.
- f) Evaporación a sequedad del eluyente a través de una corriente de nitrógeno a 35°C.
- g) Redisolución del residuo adicionando 1ml de una disolución 0.05M de SDS y obteniendo una concentración final de 10 ppm. La mezcla resultante se mantiene durante 5 minutos en un baño de ultrasonidos para asegurar su total redisolución.

Con estas condiciones experimentales también se consiguieron buenos rendimientos (superiores al 90%) en la extracción de los clorofenoles y las anilinas estudiadas. Estos resultados son similares a los obtenidos por Di Corcia et al. en estudios de extracción de fenoles [42] y anilinas [43] con columnas Carbopack B.

2.2.2. Análisis mediante MECC.

Las condiciones analíticas que permitieron la detección de los dos herbicidas fenoxiácidos con sus fenoles correspondientes, y la detección de los dos herbicidas fenilureicos con sus respectivas anilinas, fueron las siguientes:

- Fuerza iónica: 0.02M.
- Concentración de surfactante: 0.05M.
- Disolvente orgánico: 4% de butanol.

- Longitud de onda: 210 nm.

El resto de las condiciones experimentales son las descritas en el apartado 1.3. del capítulo 2.

En la figura 1 se muestra un electroferograma con los picos de los ocho compuestos analizados.

Figura 1: electroferograma correspondiente a una disolución de 10ppm de Diurón (1), 3,4-dicloroanilina (2), Monolinurón (3), 3,4-diclorofenol (4), 4-clorofenol (5), 4-cloroanilina (6), 2,4,5-T (7) y 2,4-DP (8), utilizando una concentración de surfactante (SDS) de 0.05M, una fuerza iónica de 0.02M y adicionando un 4% de Butanol.

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

3.1. FOTODEGRADACIÓN DE LAS FENILUREAS

3.1.1. Cinética de degradación.

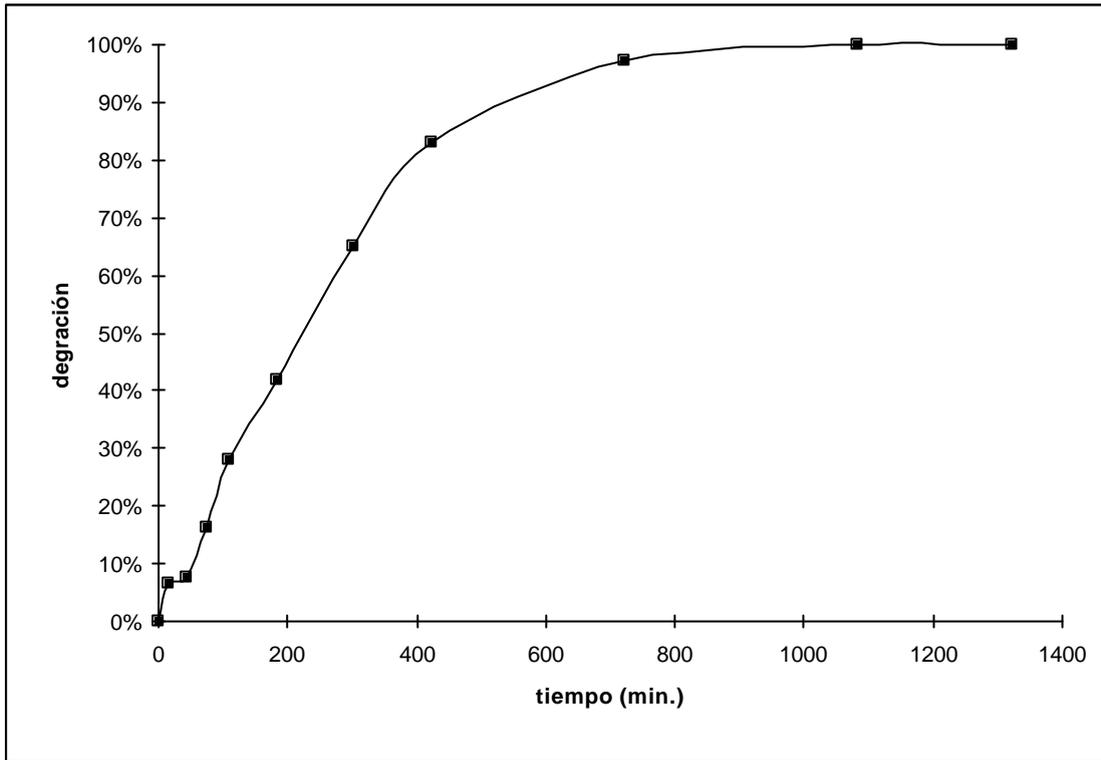
Los experimentos se realizaron con los herbicidas Diurón y Monolinurón y utilizando tanto agua desionizada como agua potable. Cada uno de estos experimentos se realizó por duplicado, inyectándose una disolución patrón cada dos muestras analizadas. La repetibilidad de estos patrones durante todos los experimentos realizados (4 experimentos para cada herbicida) fueron las siguientes:

producto	t. elución	área
Monolinurón	1.6%	1.8%
Diurón	1.7%	2.0%

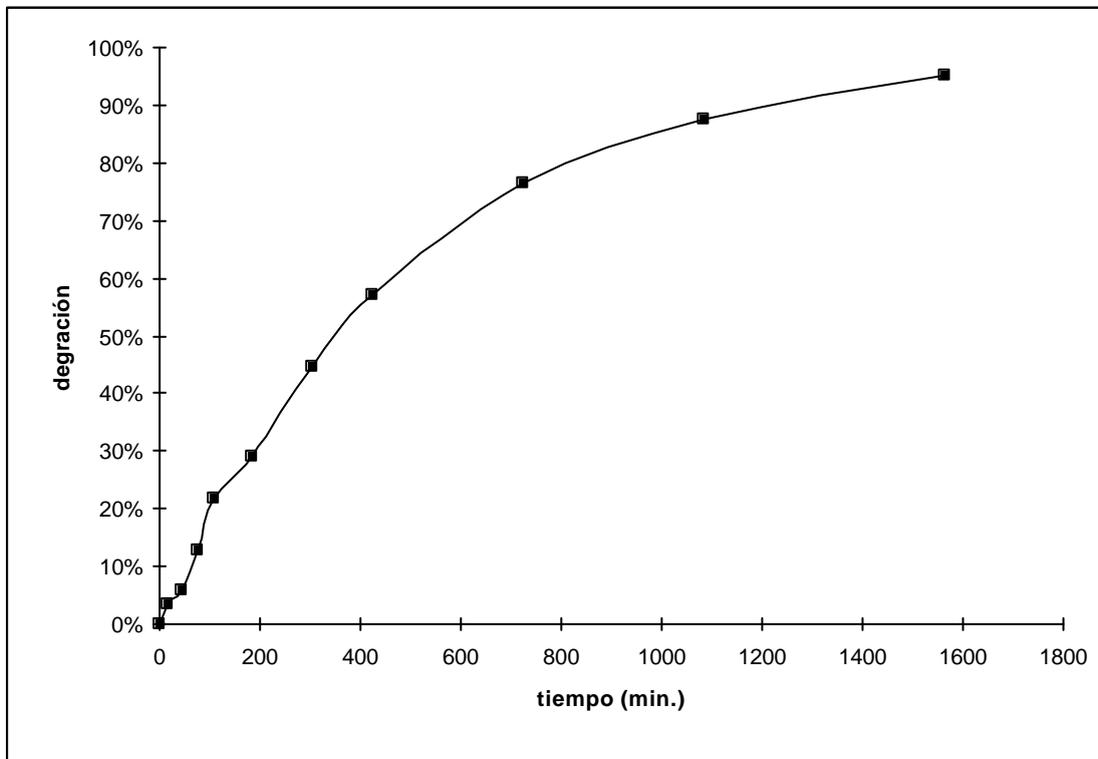
Tabla 5. Precisión del método de análisis MECC.

Tal y como se observa en esta tabla, las desviaciones estándar tanto de las áreas como de los tiempos son altos si los comparamos con valores de estudios similares y utilizando técnicas cromatográficas como el HPLC o GC [44], pero son aceptables si las comparamos con la precisión normal que se obtiene con la técnica MECC.

En las gráficas 2 y 3 se representan las cinéticas de degradación de los dos herbicidas utilizando la lámpara de Xn y agua desionizada.



Gráfica 2. Porcentaje de Diurón degradado mediante fotólisis con lámpara de Xn y utilizando agua desionizada.



Gráfica 3. Porcentaje de Monolinurón degradado mediante fotólisis con lámpara de Xn y utilizando agua desionizada.

Se ha podido observar que la velocidad de degradación en agua potable es ligeramente superior a la obtenida en agua desionizada. En general, en aguas naturales, la fotodegradación aumenta debido a la presencia de iones que pueden actuar como fotosensibilizadores de la reacción. De esta forma, Torrents et al. [45] comprobaron que los nitratos producían el radical libre hidroxilo, y Larron y Weber [46] detectaron que el calcio y el magnesio cuando se complejaban con ciertos ligandos también formaban el radical libre hidroxilo al ser irradiados con luz UV.

A partir de los resultados obtenidos experimentalmente, y teniendo en cuenta las ecuaciones descritas en el apartado 1.2, se calcularon las constantes cinéticas principales de los dos herbicidas estudiados. Estos resultados se exponen en la siguiente tabla:

	Diurón		Monolinurón	
	Agua potable	Agua desionizada	Agua potable	Agua desionizada
k	$4,97 \times 10^{-3}$	$5,29 \times 10^{-3}$	$1,90 \times 10^{-3}$	$1,93 \times 10^{-3}$
t_{1/2}	139	131	372	359

Tabla 6. Constante de velocidad (k , min^{-1}) y tiempo de vida medio ($t_{1/2}$, min.) del Monolinurón y el Diurón.

Los tiempos de vida media son comparables a los obtenidos por otros investigadores en estudios de fotodegradación de fenilureas. De esta forma, Durand et al. [12] encontraron $t_{1/2} = 2$ horas para el Linurón utilizando unas condiciones experimentales similares.

Con respecto a los experimentos de fotodegradación con luz solar, las muestras permanecieron durante 2 meses en la azotea de la E.T.S.E.I.B. Durante este tiempo, entre Mayo y Junio, hubo una climatología variada, intercalándose días soleados con días nublados. Por lo tanto, resulta prácticamente imposible realizar un cálculo preciso de la cantidad de radiación solar a la que fueron expuestas las muestras.

Los resultados de la tabla 7 indican que la degradación empieza hacia la cuarta semana de exposición y que, a partir de este momento, es un proceso lento mostrando una persistencia entre el 75% y el 85% del producto inicial después de 2 meses. No se observaron diferencias significativas entre agua potable y agua desionizada.

	Diurón	Monolinurón
2ª semana	-	-
4ª semana	6%	4%
6ª semana	17%	15%
8ª semana	25%	18%

Tabla 7. Porcentaje de degradación del Diurón y el Monolinurón durante 2 meses de exposición solar y utilizando disoluciones de 50 ppb en agua desionizada.

Este comportamiento, característico en aguas superficiales, se puede describir mediante una ecuación de primer orden modificada [3]:

$$-(\ln[C_0] - \ln[C]) = k (t-t_0) \quad (7)$$

donde t_0 es el tiempo de la fase inicial (entre el momento inicial y el momento en que empieza a observarse degradación).

A partir de los resultados experimentales, y teniendo en cuenta estas ecuaciones modificadas, se calcularon las constantes cinéticas de los dos herbicidas:

	Diurón	Monolinurón
k	$7,43 \times 10^{-3}$	$5,2 \times 10^{-3}$
$t_{1/2}$	93	133

Tabla 8. Constante de velocidad (k , días^{-1}) y tiempo de vida medio ($t_{1/2}$, días) del Monolinurón y el Diurón.

3.1.2. Productos de degradación.

En la figura 2 se muestra un electroferograma de la disolución obtenida mediante la fotólisis del Diurón utilizando lámpara de Xn. En ella se puede observar la aparición de dos productos de degradación principales que, por comparación con los correspondientes patrones, fueron identificados como Monurón (tiempo de retención de 10.4 min.) y Fenurón (tiempo de retención de 6.3 min.). Su formación es debida a la pérdida secuencial de átomos de cloro según las reacciones:

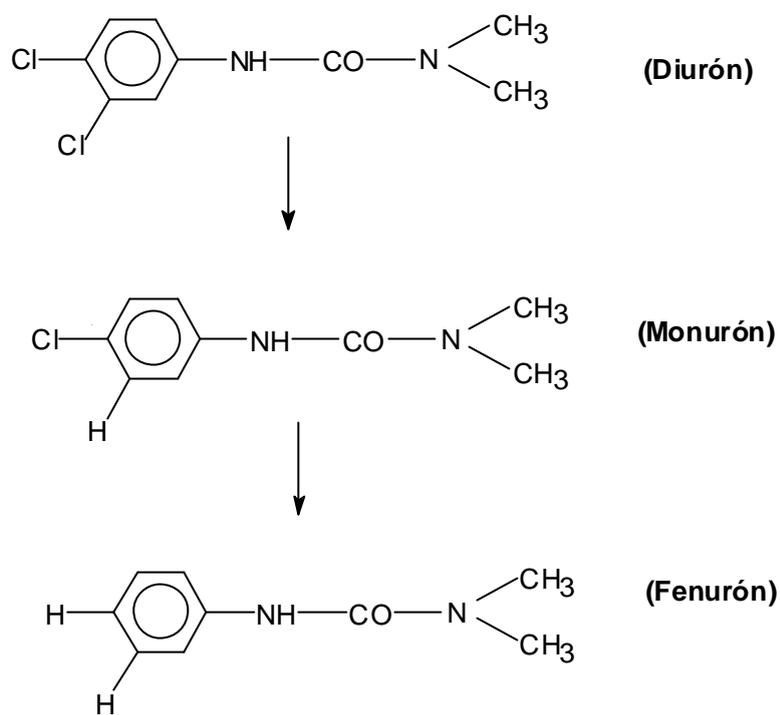
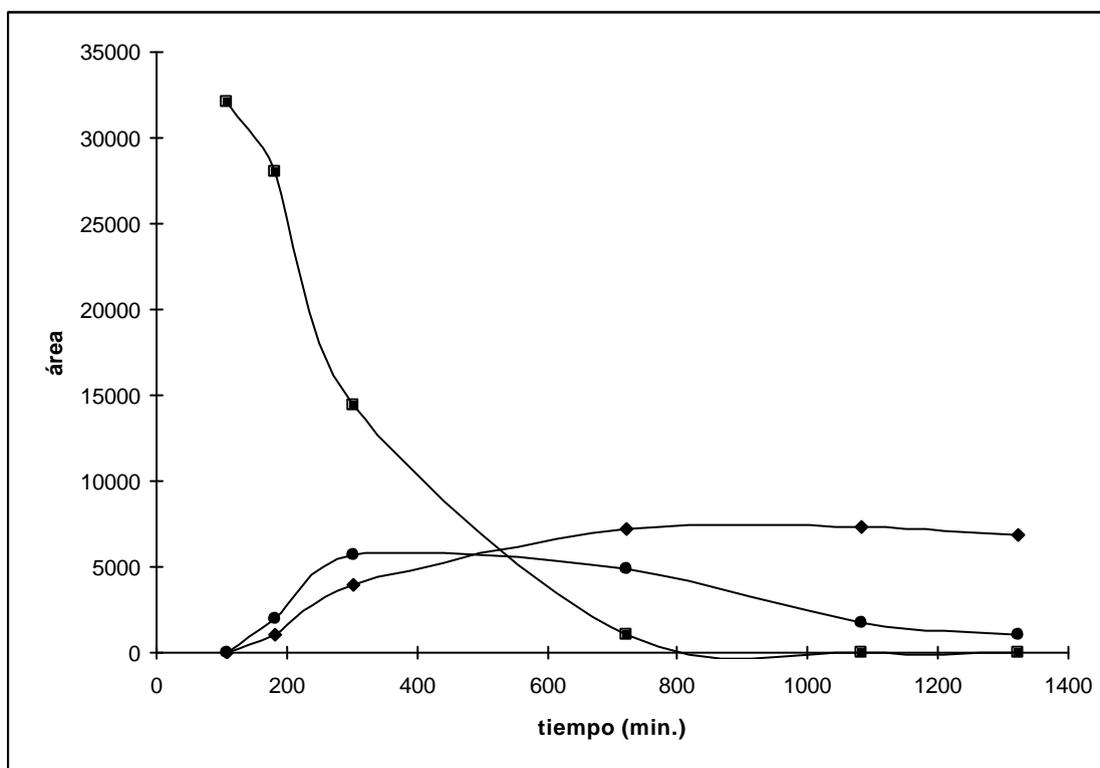


Figura 2: electroferograma del Diurón en agua desionizada antes de iniciar la fotólisis (A), después de un tiempo de irradiación con lámpara de Xn de 303 min. (B) y de 1.323 min. (C). El pico nº1 corresponde al Diurón, el nº2 al Monurón y el nº3 al Fenurón. Las condiciones experimentales están descritas en el apartado 2.2.

Hasta un tiempo de exposición de 300 min. el producto principal sigue siendo el compuesto original, el Diurón. Entre 300 y 800 min. aproximadamente, los tres pesticidas coexisten con concentraciones parecidas, mientras que a partir de 800 min. el Fenurón se convierte en el producto mayoritario. Estos resultados se observan en la siguiente gráfica.



Gráfica 4. Evolución de los productos procedentes de la fotodegradación del Diurón mediante lámpara de Xn. | Diurón ? Monurón ? Fenurón

Los productos de degradación obtenidos al realizar el proceso de fotólisis con lámpara de Xn con el Monoliurón se presentan en la figura 3. Se observan tres productos de degradación principales, todos a tiempos de retención menores que el del Monolinurón.

El hipotético esquema de degradación del herbicida supone establecer como la principal vía de degradación la pérdida de su átomo de cloro. Otras reacciones paralelas y secundarias consistirían en su hidroxilación o demetilación, tal y como se observa en la figura 4.

Figura 3: electroferograma del Monolinurón (4) en agua desionizada antes de iniciar la fotólisis (A) y después de un tiempo de irradiación con lámpara de Xn de 723 min (B). Las condiciones experimentales están descritas en el apartado 2.2.

Sin embargo, no podemos confirmar las hipótesis realizadas en la figura 4 debido a la falta de medios técnicos necesarios para ello. Por una parte no disponemos de patrones de los posibles productos de degradación, y por otra parte no disponemos de instrumentación analítica alternativa que nos facilite información adicional referente a la estructura química de estos productos (MS, RMN, etc.).

Estudios realizados por otros grupos de investigación también confirman que la reacción de fotodegradación principal en las fenilureas es la pérdida de cloro [10,12,47,48]. Otras reacciones secundarias descritas en la bibliografía son la formación de bifenilos [49] o de productos derivados de la dehidroxilación [12,50].

Para el Linurón, Durand et al. [12] postulan las siguientes vías de fotodegradación :

3.2. HIDRÓLISIS DE LAS FENILUREAS

Los experimentos se realizaron con los herbicidas Diurón y Monolinurón, utilizando agua desionizada a pH=5, pH=7 y pH=9, y agua potable a pH=7. En total se confeccionaron 4 experimentos para cada herbicida. La precisión del método analítico, obtenido a partir de los patrones inyectados entre las muestras, fue similar a la conseguida en el estudio de fotodegradación descrito en el apartado anterior.

Los resultados experimentales no muestran diferencias significativas entre la muestra disuelta con agua desionizada y agua potable. En cambio, sí que se detectó un aumento de la velocidad de hidrólisis al aumentar el pH. En la tabla siguiente se muestran algunos de los resultados obtenidos.

	Monolinurón		Diurón	
	pH = 7	pH = 9	pH = 7	pH = 9
1 ^{er} mes	14%	18%	17%	21%
2 ^o mes	32%	48%	21%	37%
3 ^{er} mes	60%	61%	23%	41%
4 ^o mes	79%	89%	33%	43%
5 ^o mes	88%	93%	35%	57%
6 ^o mes	91%	99%	42%	61%

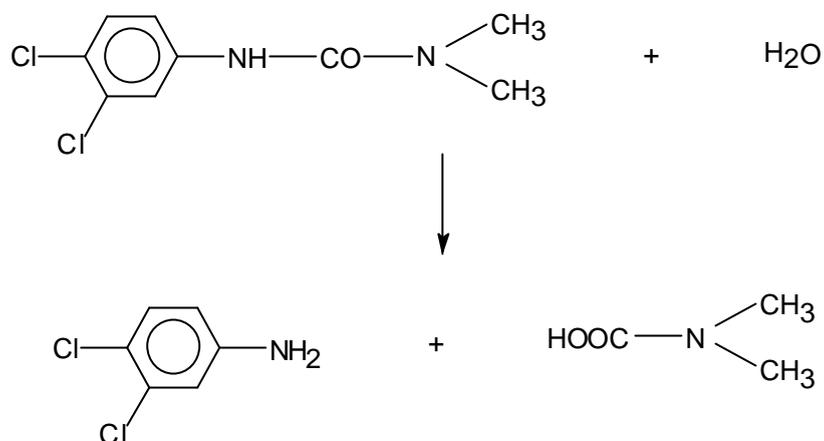
Tabla 9. Porcentaje de producto hidrolizado según el pH de la muestra, el tiempo transcurrido y utilizando disoluciones de 50 ppb en agua desionizada.

A partir de estos resultados, y utilizando las ecuaciones descritas en el apartado 1.3, se calcularon las constantes cinéticas para las dos fenilureas:

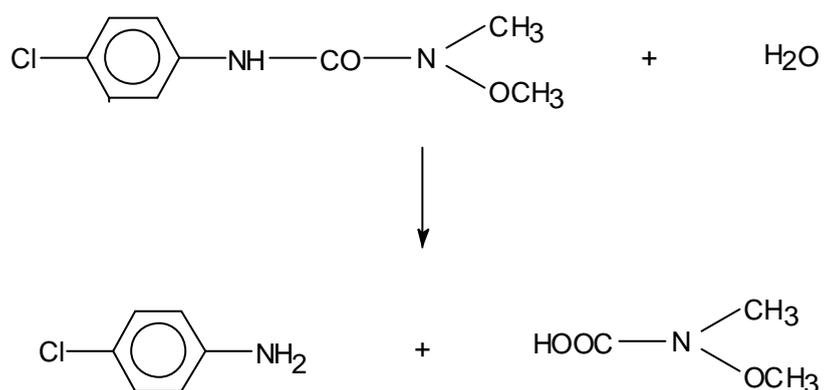
	Diurón		Monolinurón	
	pH = 7	pH = 9	pH = 7	pH = 9
k	$2,4 \times 10^{-3}$	$4,5 \times 10^{-3}$	0.016	0.028
t_{1/2}	290	155	43	25

Tabla 10. Constante de velocidad (k , días⁻¹) y tiempo de vida medio ($t_{1/2}$, días) del Monolinurón y el Diurón.

Con respecto a los productos de degradación, se identificó la 3,4-dicloroanilina como el principal producto derivado de la hidrólisis del Diurón:



y la 4-cloroanilina como el principal producto de hidrólisis del Monolinurón:



En la figura 6 se muestra un electroferograma obtenido después de 6 meses a pH=9, donde se observa claramente la presencia de las cloroanilinas.

Figura 6: electroferograma de una disolución de Diurón (1) y Monolinurón (3) en agua desionizada y a pH=9 después de permanecer 6 meses en la oscuridad. Los productos derivados de la hidrólisis detectados son la 3,4-dicloroanilina (2) y la cloroanilina (4). Las condiciones experimentales están descritas en el apartado 2.2.

3.3. FOTODEGRADACIÓN DE LOS FENOXIÁCIDOS

Los experimentos se realizaron con los herbicidas 2,4,5-T y 2,4-DP en las mismas condiciones experimentales descritas en el apartado 3.1 para la fotodegradación de las fenilureas. La precisión del método analítico se describe en la siguiente tabla:

Producto	t. elución	área
2,4-DP	1.0%	0.9%
2,4,5-T	1.0%	0.8%

Tabla 11. Precisión del método de análisis MECC.

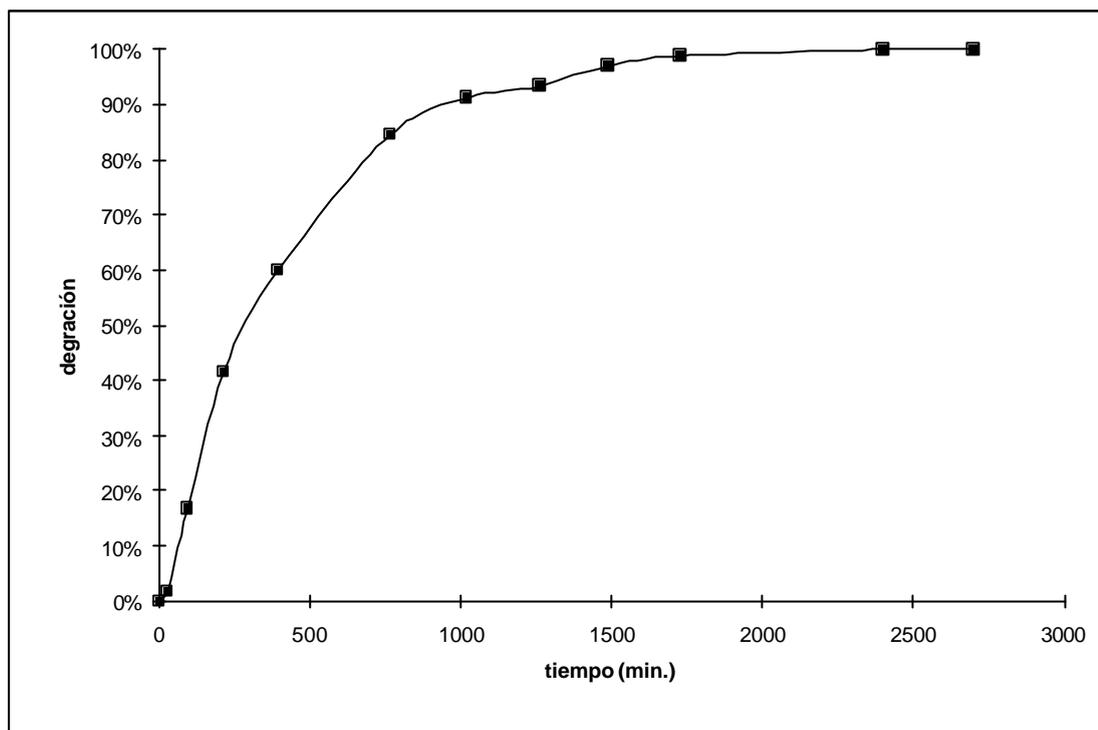
En las gráficas 5 y 6, se representan las cinéticas de degradación de los dos herbicidas utilizando la lámpara de Xn. En este caso no se han observado diferencias significativas entre la utilización de agua desionizada y agua potable.

A partir de estos resultados se calcularon las constantes cinéticas principales de los dos herbicidas. Los resultados se exponen en la siguiente tabla:

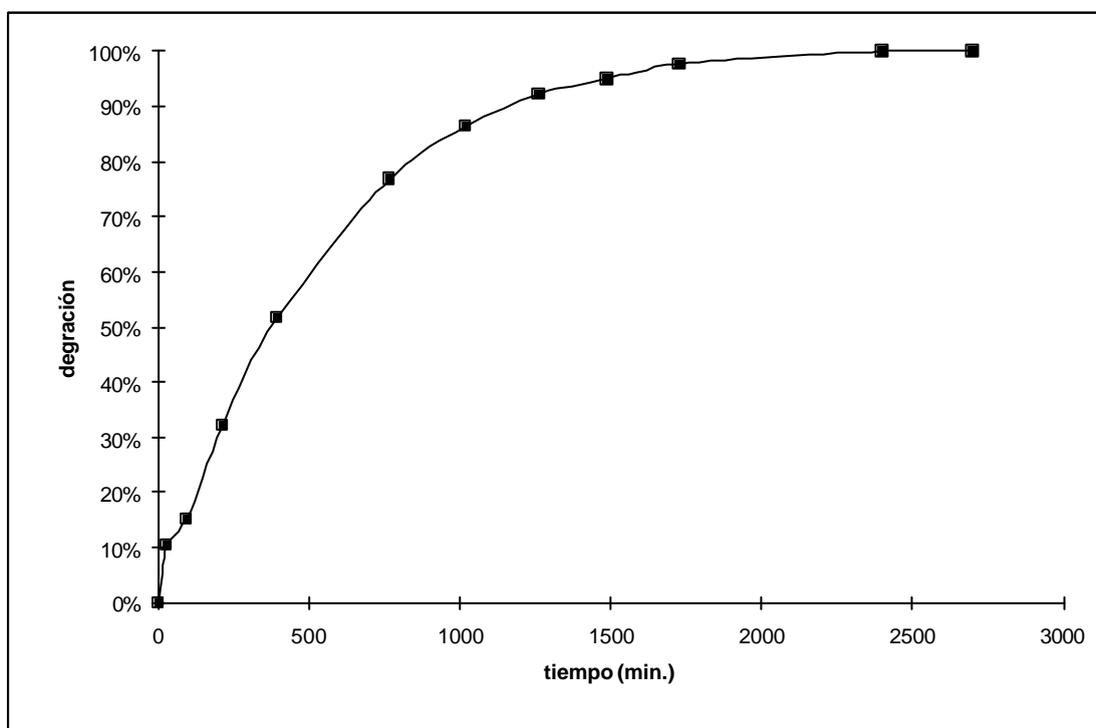
	2,4-DP		2,4,5-T	
	Agua potable	Agua desionizada	Agua potable	Agua desionizada
k	$2,42 \times 10^{-3}$	$2,44 \times 10^{-3}$	$2,09 \times 10^{-3}$	$2,08 \times 10^{-3}$
t_{1/2}	286	284	331	333

Tabla 12. Constante de velocidad (k , min^{-1}) y tiempo de vida medio ($t_{1/2}$, min.) del 2,4-DP y el 2,4,5-T.

Estos tiempos de vida media son inferiores a los obtenidos por otros autores en experimentos de fotodegradación en laboratorio, que oscilan entre 5 y 20 días según las condiciones de trabajo [51].



Gráfica 5. Porcentaje de 2,4-DP degradado mediante fotólisis con lámpara de Xn y utilizando agua desionizada.



Gráfica 6. Porcentaje de 2,4,5-T degradado mediante fotólisis con lámpara de Xn y utilizando agua desionizada.

Los productos de degradación obtenidos al realizar el proceso de fotólisis mediante lámpara de Xn con el 2,4-DP y el 2,4,5-T se representan en las figuras 7 y 8.

Aunque se acepta de forma general que los productos mayoritarios de la fotodegradación de los fenoxiácidos son sus correspondientes clorofenoles [51,52], en el presente estudio se ha podido comprobar que ni el 2,4-diclorofenol ni el 2,4,5-triclorofenol aparecen como productos de degradación del 2,4-DP y del 2,4,5-T respectivamente. Aunque, igual como sucedía en la degradación del Monolinurón y debido a la falta de los medios técnicos necesarios, no se ha podido confirmar la estructura química de los productos detectados, estudios realizados por otros grupos de investigación [52,53] confirman que las reacciones de fotodegradación principales son la pérdida de cloro y la formación de derivados hidroxilados, como es el ácido 2-hidroxi-4,5-diclorofenoxiacético. También se describe la presencia de los correspondientes anisoles y fenoles (aunque en este trabajo no se han podido detectar).

Con respecto a los experimentos de fotodegradación con luz solar no se observó ninguna variación de la concentración de los herbicidas durante los dos meses de exposición. Estos resultados difieren claramente de los obtenidos por Crosby y Wang en sus estudios de degradación del 2,4,5-T [52]. Estos autores obtuvieron un 17% de degradación en medio acuoso después de 4 días de exposición solar, dando un tiempo de vida media del orden de 15 días, aunque las condiciones utilizadas fueron diferentes de las de nuestro estudio (utilizaron luz solar durante los meses de verano y en California).

Figura 7: electroferograma del 2,4-DP (1) en agua desionizada antes de iniciar la fotólisis (A) y después de un tiempo de irradiación con lámpara de Xn de 766 min. (B). Las condiciones experimentales están descritas en el apartado 2.2.

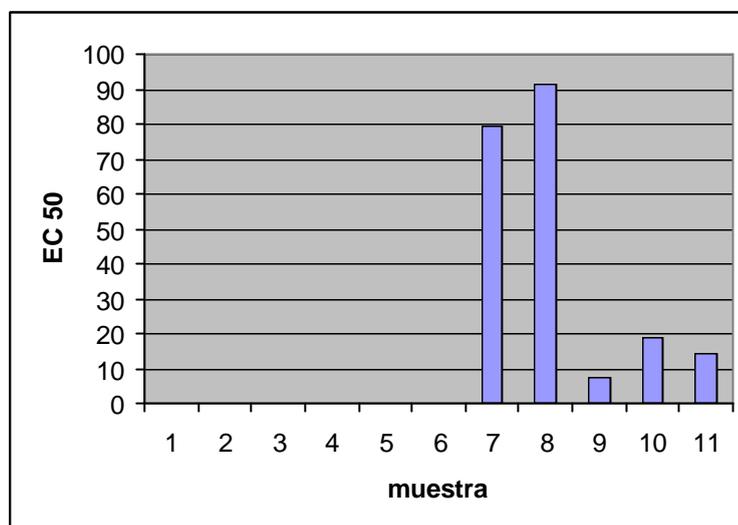
Figura 8: electroferograma del 2,4,5-T (2) en agua desionizada antes de iniciar la fotólisis (A) y después de un tiempo de irradiación con lámpara de Xn de 900 min. (B). Las condiciones experimentales están descritas en el apartado 2.2.

3.4. HIDRÓLISIS DE LOS FENOXIÁCIDOS

Se realizaron los mismos experimentos que con las fenilureas, utilizando agua desionizada a pH=5,7 y 9 y agua potable a pH=7. Las muestras permanecieron durante 6 meses en la oscuridad a una temperatura constante de 25°C. Después de este período de tiempo no se observaron variaciones importantes en la concentración de las muestras, lo cual demuestra la estabilidad de estos herbicidas frente a los procesos de hidrólisis [51].

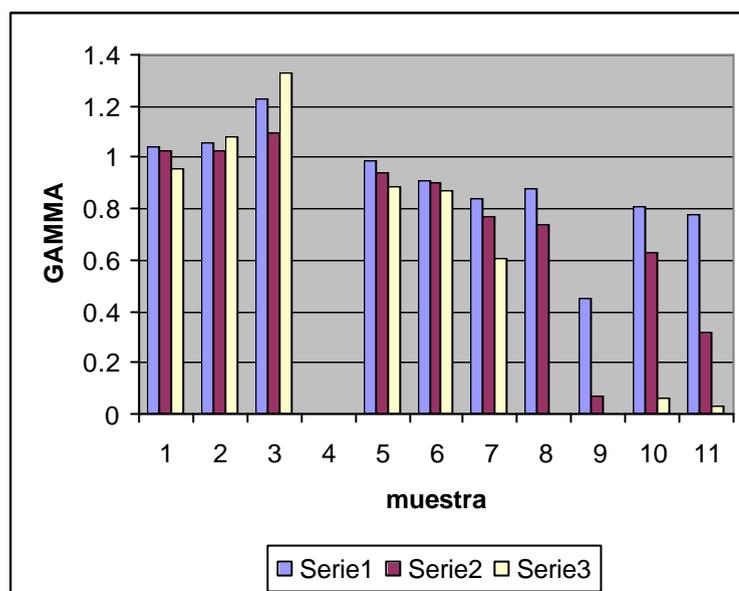
3.5. ESTUDIO DE TOXICIDAD

A partir de los datos obtenidos en los análisis mediante el test Microtox, se determinó la EC_{50} de cada una de las muestras, a los 15 minutos.



Gráfica 7. EC_{50} de las muestras.

En los resultados presentados en la gráfica 7 se puede observar que para las muestras no degradadas (de la 1 a la 6), la EC_{50} no se pudo determinar, debido probablemente a que la concentración de los herbicidas estaba lejos de la necesaria para producir efectos detectables en el test Microtox. Por ello, tal como se ha mencionado anteriormente, se procedió al estudio de toxicidad analizando los valores de GAMMA relativos para las muestras a distintas concentraciones. Estos valores se han calculado a partir de la relación de intensidades (I_t/I_0) de cada muestra, respecto a la relación de intensidades del test control (concentración de herbicida cero). Por lo tanto, si hay toxicidad, el valor de GAMMA relativo debe ser inferior a 1. Los resultados se muestran en la siguiente gráfica:



Gráfica 8: valores de GAMMA para las distintas muestras a distintas concentraciones: serie 1 (11.25%), serie 2 (22.5%), serie 3 (45%).

Se puede observar que, para las cuatro primeras muestras, que corresponden a los herbicidas individuales sin degradar, los valores de GAMMA son iguales o superiores a 1, indicando que no presentan toxicidad. Las muestras 5 y 6, que corresponden a mezclas binarias de los herbicidas sin degradar, dan valores de GAMMA elevados pero inferiores a 1, que van disminuyendo al aumentar la concentración de herbicida, lo que podría indicar una leve toxicidad de estas muestras, y por lo tanto un cierto efecto aditivo de las mezclas [36].

Las muestras 7, 8, 9 y 10 corresponden a los herbicidas individuales después de la fotodegradación. De forma general, se aprecia un aumento de toxicidad respecto a los herbicidas iniciales, lo que evidencia la aparición de concentraciones significativas de productos de degradación tóxicos. Este efecto, que se puede apreciar levemente en las muestras 7 y 8 que corresponden a las fenilureas fotodegradadas, es mucho más acusado en el caso de las muestras 9 y 10 correspondientes a los fenoxiácidos fotodegradados. En este caso, otros estudios ya demostraron que los productos producidos en la fotodegradación parcial de los fenoxiácidos, en concreto el 2,4-D, eran más tóxicos que el compuesto inicial [54].

La muestra 11 corresponde a la mezcla binaria de fenilureas hidrolizadas. Se puede observar un aumento de toxicidad respecto a la misma mezcla sin hidrolizar, que se puede explicar por la degradación de los herbicidas para dar cloroanilinas, como se observó en los experimentos de hidrólisis.

4. CONCLUSIONES

En este capítulo se ha demostrado la viabilidad del sistema MECC/SPE con columnas “Carbopack” para realizar estudios de degradación de plaguicidas.

Aunque los resultados obtenidos en algunos casos han sido incompletos debido a la falta de instrumentación analítica adecuada, en líneas generales el estudio realizado proporciona datos relevantes que ayudan a comprender mejor los mecanismos de degradación de los herbicidas estudiados: cinéticas de reacción y constantes de velocidad de fotodegradación, influencia del tipo de agua, productos de fotodegradación, productos derivados de la hidrólisis, etc.

Resultan especialmente interesantes los resultados obtenidos con las fenilureas, ya que se observa claramente como la vía de degradación fotolítica principal es la pérdida de sucesivos átomos de cloro mientras que la hidrólisis da como resultado la formación de anilinas.

El estudio de toxicidad indica de forma general, que los productos de degradación tanto fotolítica como hidrolítica, son más tóxicos que los herbicidas originales.

5. BIBLIOGRAFÍA

1. Voudrias, E.A., Reinhard, M. *ACS Symposium Series*, 323 (1986) 462.
2. Helling, C.S., Kearney, P.C., Alexander, M. *Adv. Agron.* 23 (1971) 147.
3. Matthes, G. *Pesticides in Ground and Surface Water*. Springer-Verlag, Alemania, 1994, 191.
4. Stumm W., Morgan J.J., *Aquatic Chemistry*, Wiley Interscience, New York, 1976.
5. Leifer A., *The kinetics of Environmental Aquatic Photochemistry*. American Chemical Society, Washington, 1988.
6. Hwang H.M., Hodson R.E., Lee R.F., *Photochemistry of environmental aquatic systems*, ACS symposium series, 327, 1987.
7. Zepp R.G., Schlotzhauer P.F., Sink R.M., *Environ. Sci. Technol.* 19 (1985), 74.
8. Draper W.M., Crosby D.G., *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 12 (1983), 121
9. Fukuda K., Inagaki Y., Marumaya T., Kojima H.I., Yoshida T. *Chemosphere* 17 (1988), 651.
10. Durand G., Barceló D., Albaigés J., Mansour M., *Chromatographia* 29 (1990), 120.
11. Choudry G.G., *The Handbook of Environmental Chemistry*, O. Hutzinger ed. (1982), Berlin, Vol. 2, pag. 103.
12. Durand G., Bertrand N., Barceló D., *J. Chromatogr.* 554 (1991), 233.
13. Bertrand N., Barceló D. *Anal. Chem. Acta* 254 (1991), 235.
14. Samanidou V., Fytianos F., Pfister G., Bahadir M., *Sci. Total Environ.* 76 (1988), 85.
15. Durand G., Barceló D., *J. Chromatogr.* 502 (1990), 275.
16. Chuckwudebe R., March R.B., Othman M., Fukuto T.R., *J. Agric. Food Chem.* 37 (1989), 539.
17. Rosen J.D., Strusz R.F., Still C.C., *J. Agric. Food Chem.* 17 (1969), 206.
18. Peñuela G., Barceló D., *J. Chromatogr.* 795 (1998), 93.
19. Kramer J.B., Canonica S., Hoigné J., Kaschig J., *Environ. Sci. Technol.* 30 (1996), 2227.
20. Dung M.H., O'Keefe P.W., *Environ. Sci. Technol.* 28 (1994), 549.
21. Chiron S., Torres J.A., Fernández A., Alpendurada M.F., Barceló D., *Inter. J. Environ. Anal. Chem.* 65 (1996), 37.
22. Daley Jr., O'Malley R.F., *Problems in Chemistry*, 1ª edición, Marcel Dekker inc., New York, 1974.
23. Levine I.N., *Physical Chemistry*, 1ª edición, McGraw-Hill Book Co., New York, 1978.
24. Zhang P-Ch., Scudato R.J., Pagano J.J., Roberts R.N., *Chemosphere* 26 (1993), 1213.
25. Pelizzetti E., Maurino V., Minero C., Carlin V., Pramauro E., Zerbinati O., Tosato M.L., *Environ. Sci. Technol.* 24 (1990), 1559.

26. Pramauro E., Vincenti M., Augugliario V., Palmisano L., *Environ. Sci. Technol.* 27 (1993), 1790.
27. Li Z.M., Comfort S.D., Shea P.J., *J. Environ. Qual.* 26 (1997), 480.
28. Aguilar M., Farran A., Martí V., *Sci. Total Environ.* 132 (1993), 133.
29. Ribó, J.M. *Afinidad* 437 (1992) 7.
30. Karuppiah, M., Gupta, G., *Ecotoxicology and Environmental Safety* 35 (1996) 81.
31. Gupta, G., Karuppiah, M. *Chemosphere*, 33 (1996) 939.
32. Svenson, A., Edsholt, E., Ricking, M., Remberger, M., Rottorp, J. *Environmental Toxicology and Water Quality* 11 (1996) 193.
33. Dutka, B.J., Mcinnis, R., Jurkovic, A., Liu, D., Castillo, G. *Environmental Toxicology and Water Quality* 11 (1996) 237.
34. Gupta, G., Baummer, J. *J. of Hazardous Materials* 45 (1996) 185.
35. Kharu, A., Tomson, K., Pall, T., Kulm, I. *Water Sci. and Technol.* 33 (1996) 147.
36. Abdelghani, A.A., Tchounwou, P.B., Anderson, A.C., Sujono, H., Heyer, L.R., Monkiedje, A., *Environmental Toxicology and Water Quality* 12 (1997) 237.
37. Karuppiah, M., Liggans, G., Gupta, G. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 36 (1997) 180.
38. Thomulka, K.W., Lange, J.H. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 36 (1997) 189.
39. Bard L.A., *Evaluating Chemical Photodegradation: Instrumental approach*, American Laboratory News Edition, 1992.
40. Yager J.E., Yue Ch. D., *Environ. Toxic. Chem.* 7 (1988), 1003.
41. Ribó, J.M., Zaruk, B.M., Hunter, H., Kaiser, K.L.E., *J. Great Lakes Res.*, 11 (1985) 297.
42. Di Corcia A., Marchetti M., Samperi R., *Anal Chem.* 58 (1986), 2.048.
43. Di Corcia A., Samperi R., *Anal Chem.* 62 (1990), 1.490.
44. Li S.F.Y., *Capillary Electrophoresis, Principles, Practice and Applications*. J. Chromat. Library. Ed. Elsevier. Vol.52. Amsterdam, 1993.
45. Torrents A., Anderson B.G., Bilboulia S., Johnson W.E., Hapeman C.J., *Environ. Sci. Technol.*, 31 (1997), 1476.
46. Larron R.A., Weber E.J., *Reactions Mechanisms in Environmental Organic Chemistry*, CRC Press, 1994.
47. Roof A.M.M., *The Handbook of Environmental Chemistry*, O. Hutzinger ed. (1982), Berlín, Vol.2, pag. 43.
48. Kotzias D., Klein W., Korte F., *Chemosphere* 4 (1974), 161.
49. Tanaka F.S., Wlen R.G., Hoffer B.L., *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.* 23 (1984), 1.
50. Spulak Von Franz, Staudacher H., Rohleder H., *Chemiker Zeitung* 6 (1978), 205.
51. Howard, P.H. *Handbook of Environmental Fate and Exposure Data for Organic Chemicals. Volume III. Pesticides*. Lewis Publishers, EEUU, 1991.

52. Crosby D.G., Wong A.S., *J. Agric. Food Chem.* 21 (1973), 1.052.
53. Skurlatov Y.I., *J. Agric. Food Chem.* 31 (1983), 1.065.
54. Lu, M.C., Chen, J.N. *Water Science and Technology* 36 (1997) 117.