



CENTRO INTERNACIONAL DE ESTUDOS
DE DOUTORAMENTO E AVANZADOS
DA USC (CIEDUS)

TESIS DE DOCTORADO

**ESTUDIOS ANALÍTICOS DE DETERMINACIÓN Y
TRANSFORMACIÓN DE COMPUESTOS
NATURALES Y ANTROPOGÉNICOS DE
INTERÉS EN VITICULTURA**

Tamara Rodríguez Cabo

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA QUÍMICA

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2017



DECLARACIÓN DEL AUTOR DE LA TESIS

ESTUDIOS ANALÍTICOS DE DETERMINACIÓN Y TRANSFORMACIÓN DE COMPUESTOS NATURALES Y ANTROPOGÉNICOS DE INTERÉS EN VITICULTURA

Dña. Tamara Rodríguez Cabo

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento, y declaro que:

- 1) *La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.*
- 2) *En su caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.*
- 3) *La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide con la versión enviada en formato electrónico.*
- 4) *Confirmo que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.*

En Santiago de Compostela, 20 de Octubre de 2017

Fdo. Tamara Rodríguez Cabo

AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR / TUTOR DE LA TESIS

**ESTUDIOS ANALÍTICOS DE DETERMINACIÓN Y
TRANSFORMACIÓN DE COMPUESTOS
NATURALES Y ANTROPOGÉNICOS DE
INTERÉS EN VITICULTURA**

D. Isaac Rodríguez Pereiro
Dña. María Ramil Criado

INFORMAN:

Que la presente tesis, corresponde con el trabajo realizado por Dña. Tamara Rodríguez Cabo, bajo mi dirección, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director de ésta no incurre en las causas de abstención establecidas en Ley 40/2015.

En Santiago de Compostela, 20 de Octubre de 2017

Fdo. Isaac Rodríguez Pereiro

Fdo. María Ramil Criado

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, debo agradecer al Ministerio de Economía, Industria y Competitividad el contrato predoctoral para la formación de doctores (FPI) de estos últimos cuatro años, así como a la Xunta de Galicia y a los fondos FEDER (proyectos CTQ2015-68660-P y GRC2013-020) por la financiación recibida para el desarrollo de las actividades descritas en esta memoria de Tesis.

Al Departamento de Química Analítica de la Universidad de Santiago de Compostela y al Instituto de Investigación y Análisis Alimentario (IIAA), en especial a Rafael Cela por haberme acogido en el Grupo de Cromatografía y Quimiometría (GI-1626) y poner los medios necesarios para la realización de este trabajo. A mis directores, Isaac Rodríguez y María Ramil por el apoyo y los conocimientos que me han brindado, así como por su tiempo y dedicación a esta Tesis.

A todos los miembros del grupo de investigación, compañeros y amigos: Sara, Jorge, Inma, Rosa, Iria, Josu, Inés, Gabi, Beni, Vero, Leti, Tania, Eugenia, Edgar... Aunque algunos no estéis desde hace tiempo en el IIAA, todavía guardo muy buenos recuerdos por haberme acompañado en alguna etapa de esta “aventura”, haciéndola en ocasiones más llevadera con nuestros descansos para el café y la merienda. Además, agradecer a todos los estudiantes de fin de grado o máster, prácticas externas y estancias de doctorado que hayan colaborado de algún modo conmigo en el desarrollo de este trabajo.

Gracias a los Prof. Jean-Michel Mérillon y Tristan Richard por haber hecho posible mi estancia en el grupo de investigación de *Molécules d'Intérêt biologique* (MIB) perteneciente al *Institut des Sciences de la Vigne et du Vin* (ISVV) de *l'Université à Bordeaux*. Asimismo, a Josep por orientarme en el trabajo y los buenos momentos al salir del laboratorio con los “Spanish speakers” (Ana A., Ana G. y Noelia) y demás compañeros de *la Roquette*. También a Inma y Raquel por acompañarme en esos largos días durante la estancia en Francia mientras se echaba de menos la tierra y por ese inolvidable viaje a París.

A mis amigas de Santiago, con las que me encontré en el “cole” al principio de nuestra vida santiagouesa, Lara, Lucía y Dori. Vosotras sabéis mejor que nadie que los

comienzos de esta Tesis no fueron del todo fáciles, pero, al final todo esfuerzo tiene su recompensa. A mi compañera de promoción Nuria, por haber sido siempre mi ejemplo de constancia y fuerza de voluntad tanto en los estudios como el trabajo. Gracias además por los años de convivencia, en lo que debo incluir también a Sara y, aunque sé que *“no es mi perro”*, también a Perce aunque, en ese caso, creo que la compañía era la mayor parte de las veces interesada.

Gracias a mis amigos de siempre Majo, Marco, Antonio, Gonzalo, Adri, Javi, David y Uxía. Aunque oposiciones, trabajos, Tesis o cambios de país nos hayan mantenido distanciados, os habéis preocupado, vía telefónica o durante las dos veces al año en las que nos reunimos todos, por mí y como avanzaba el trabajo, aunque no entendierais mucho lo que os contaba sobre lo que hacía en el laboratorio.

A mi familia, sobre todo a mi madre porque sin su esfuerzo y sus buenos consejos hoy no estaría escribiendo esta Tesis. Gracias por animarme a seguir adelante, por tu atención, apoyo y cariño.

A Iván, por haberme acompañado durante esta última etapa de Tesis, sin duda la más difícil, confiando en mí aun cuando yo no lo hacía. Gracias por tener una paciencia infinita y por darme siempre otra visión de las cosas y, en la mayor parte de los casos la acertada.



ÍNDICE

I. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	1
II. INTRODUCCIÓN.....	7
II.A. COMPUESTOS ESTUDIADOS	9
1. PESTICIDAS	11
1.1. Definición y clasificación	11
1.1.1. FUNGICIDAS	12
1.1.2. INSECTICIDAS	15
1.1.3. HERBICIDAS	18
1.2. Usos y aplicaciones	19
1.3. Toxicidad	20
1.4. Legislación.....	22
1.5. Niveles de pesticidas en vino	24
2. MICOTOXINAS. OCRATOXINA A.....	26
2.1. Definición, estructura y propiedades.....	26
2.2. Toxicidad	27
2.3. Legislación.....	28
2.4. Niveles de Ocratoxina A en vino	29
3. ESTILBENOS	30
3.1. Definición, estructura y propiedades.....	30
3.2. Efectos y aplicaciones del consumo de estilbenos.....	31
3.3. Niveles de estilbenos en vino.....	32
II.B. METODOLOGÍA DE PREPARACIÓN DE MUESTRA.....	35
1. EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPE).....	37
1.1. Etapas del proceso	38
1.2. Formatos y dispositivos comerciales.....	39

1.3. Materiales adsorbentes	41
1.4. Aplicaciones de SPE a la determinación de pesticidas, estilbenos y OTA en vino	46
2. MICROEXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA (DLLME)	50
2.1. Etapas del proceso	50
2.2. Modalidades de trabajo en DLLME	51
2.3. Fundamento teórico	53
2.4. Factores que afectan a la eficacia de extracción.....	54
2.4.1. Selección del agente extractante	54
2.4.2. Selección del agente dispersante.....	55
2.4.3. Selección del volumen de extractante	55
2.4.4. Selección del volumen de dispersante.....	56
2.4.5. Tiempos de extracción y centrifugación	56
2.4.6. Fuerza iónica y pH de la muestra	56
2.4.7. Agentes derivatizantes.....	57
2.5. Aplicaciones de DLLME a la determinación de pesticidas y estilbenos en vino...	57
2.6. Pretratamiento de la muestra en DLLME: combinación SPE-DLLME	59
3. MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA. USO DE ADSORBENTES DE BAJO COSTE ...	61
3.1. Fundamento teórico	61
3.2. Etapas del proceso	62
3.3. Dispositivos	63
3.4. Otras aplicaciones de las técnicas de microextracción	64
II.C. TÉCNICAS DE DETERMINACIÓN	67
1. ESPECTROMETRÍA DE MASAS	69
1.1. Analizadores.....	69
1.1.1. Analizador cuadrupolar.....	69
1.1.2. Analizador de trampa de iones	71
1.1.3. Analizador de tiempo de vuelo	72

1.2. Espectrometría de masas en tándem.....	73
1.2.1. Triple cuadrupolo	74
1.2.2. Cuadrupolo-Tiempo de vuelo.....	75
2. ACOPLAMIENTO ESPECTROMETRÍA DE MASAS-TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS .	77
2.1. Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas (GC-MS).....	77
2.1.1. Columnas para GC-MS.....	78
2.1.2. Inyección de la muestra	78
2.1.3. Modos de ionización	79
2.1.4. Derivatización.....	80
2.1.5. Aplicaciones de GC-MS a la determinación de los compuestos estudiados en vino	81
2.2. Cromatografía de Líquidos-Espectrometría de Masas (LC-MS).....	82
2.2.1. Columnas para LC-MS	83
2.2.2. Modos de ionización	83
2.2.3. Aplicaciones de LC-MS a la determinación de los compuestos estudiados en vino	85
2.3. Uso del acoplamiento Espectrometría de Masas-Técnicas Cromatográficas en estudios de transformación	87
II.D. BIBLIOGRAFÍA	89
III. DESARROLLO DE METODOLOGÍA ANALÍTICA.....	113
III.A. MICROEXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA (DLLME).....	117
<u>PUBLICACIÓN III.A.1:</u> Dispersive liquid-liquid microextraction using non-chlorinated, lighter than water solvents for gas chromatography-mass spectrometry determination of fungicides in wine	123
<u>PUBLICACIÓN III.A.2:</u> Determination of hydroxylated stilbenes in wine by dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography mass spectrometry..	135
III.B. EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPE)	149

<u>PUBLICACIÓN III.B.1</u> : Selective extraction and determination of neonicotinoid insecticides in wine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry	157
<u>PUBLICACIÓN III.B.2</u> : Liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry selective determination of Ochratoxin A in wine.....	169
<u>PUBLICACIÓN III.B.3</u> : Investigation of liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry performance for identification and determination of hydroxylated stilbene antioxidants in wine	179
<u>PUBLICACIÓN III.B.4</u> : Multiclass semi-volatile compounds determination in wine by gas chromatography accurate time-of-flight mass spectrometry.....	197
IV. ESTUDIOS DE ESTABILIDAD Y TRANSFORMACIÓN.....	217
IV.A. FOTOTRANSFORMACIÓN	221
<u>PUBLICACIÓN IV.A.1</u> : Assessment of silicone as support to investigate the transformation routes of organic chemicals under environmental conditions and UV exposure. Application to selected fungicides	229
<u>PUBLICACIÓN IV.A.2</u> : Evaluation of nitrate effects in the photodegradability of Cyprodinil. Kinetics study and transformation products elucidation	247
<u>PUBLICACIÓN IV.A.3</u> : Comprehensive evaluation of the photo-transformation routes of <i>trans</i> -Resveratrol	265
IV.B. REACCIONES CON CLORO	285
<u>PUBLICACIÓN IV.B.1</u> : Liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry evaluation of fungicides reactivity in free chlorine containing water samples	289
V. DISCUSIÓN INTEGRADORA DE RESULTADOS.....	307
VI. CONCLUSIONES	317
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	323
ÍNDICE DE FIGURAS.....	331

ÍNDICE DE TABLAS.....335

ANEXO: OTRAS PUBLICACIONES.....339







I. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS



El vino es una de las bebidas alcohólicas de mayor consumo del mundo, alcanzando una producción total de 259 millones de hectolitros en el año 2016, según estimaciones de la Organización Internacional de la Viña y el Vino (*Organisation Internationale de la Vigne et du Vin*, OIV), siendo Italia el primer país productor mundial, seguido de Francia y España [1]. La Sociedad Española de Nutrición Comunitaria (SENC) ha incluido el vino como uno de los alimentos de consumo opcional dentro de su Pirámide de Alimentación Saludable [2] ya que se han demostrado efectos beneficiosos en la salud de los consumidores de este producto, tales como la reducción del riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares [3], algunos tipos de cáncer [4,5], diabetes [6] o demencia [7]. Estas propiedades están asociadas a la presencia de compuestos fenólicos, producidos de manera natural en las semillas y piel de uva y transferidos al vino en el proceso de fermentación y en su almacenamiento en barricas de madera de roble después de la fermentación [8].

Por otro lado, debido a las condiciones climáticas existentes en las zonas de producción de vino, es frecuente la aparición de plagas de insectos y ataques de hongos, así como el crecimiento de malas hierbas que afectan al desarrollo de la vid, pudiendo generar pérdidas importantes en la producción de uva, así como influir de manera negativa en la calidad del vino, por lo que es frecuente el uso de pesticidas. En ocasiones se producen abusos en el uso de estos productos sin tener en cuenta las recomendaciones de los fabricantes en cuanto a dosis o plazos de seguridad, provocando de esa manera la transferencia de pesticidas a la uva y, debido a que no se eliminan completamente durante el proceso de vinificación [9], la contaminación del vino, pudiendo alterar así su calidad, además de provocar alteraciones en la salud de los consumidores bien por la presencia de los pesticidas que se apliquen o por derivados de estos con una mayor toxicidad [10].

Debido a la presencia de hongos, es frecuente la contaminación de varios tipos de alimentos, como cereales o piensos, por micotoxinas. En el caso del vino, la contaminación más frecuente con micotoxinas tiene lugar por la acción de la Ocratoxina A, generada de manera natural en la vid por la presencia de varias especies de hongos de tipo *Aspergillus* y *Penicillium*, que debilitan tanto la vid como sus frutos, alterando la calidad del vino producido, y suponiendo un riesgo serio para la salud de los consumidores, debidos entre otros, a sus efectos nefrotóxicos y cancerígenos [11,12].

Por este motivo, es necesario disponer de metodologías analíticas adecuadas para el análisis de estos compuestos en vino con el fin de poder controlar sus efectos. Los objetivos de esta Tesis se han centrado en la optimización de métodos analíticos empleando técnicas de extracción que minimicen el tiempo y los costes de preparación de muestra, además de ofrecer unas altas prestaciones analíticas tales como bajos límites de cuantificación (LOQs), precisión y exactitud. Las metodologías de preparación de muestra desarrolladas se han combinado con técnicas de determinación cromatográficas (líquidos y gases) acopladas a espectrometría de masas, permitiendo conocer los niveles de los analitos en muestras reales y ofreciendo la posibilidad de buscar e identificar otros compuestos resultado de la transformación de pesticidas y otros analitos a través de procesos oxidativos.

Por ello, los objetivos de este trabajo se pueden resumir en cuatro grupos:

- Desarrollo de metodología analítica para la determinación de compuestos de origen natural en vino y contaminantes antropogénicos que se transfieren a éste en la etapa de vinificación.
- Cuantificación de estos compuestos en vino y búsqueda de otros desconocidos *a priori*, pero presentes también en las muestras.
- Estudios de estabilidad de pesticidas y estilbenos con el fin de conocer el comportamiento de estos compuestos en distintas condiciones ambientales, con especial atención a su estabilidad bajo radiación solar y ultravioleta.
- Búsqueda e identificación de productos de transformación generados para establecer las rutas de transformación de los compuestos precursores seleccionados.

REFERENCIAS

- [1] OIV, Organización Internacional de la Viña y el Vino. <http://www.oiv.int/es/actualidad-de-la-oiv/la-produccion-mundial-de-vino-en-2016-se-estima-en-259-mill-hl>
- [2] SENC, Sociedad Española de Nutrición Comunitaria, Guía de la alimentación saludable 2004. Recomendaciones saludables, 8-23.
- [3] R. Zamora-Ros, M. Urpi-Sarda, R.M. Lamuela-Raventós, M.Á. Martínez-González, J. Salas-Salvadó, F. Arós, M. Fitó, J. Lapetra, R. Estruch, C. Andres-Lacueva, High urinary levels of Resveratrol metabolites are associated with a reduction in the prevalence of cardiovascular risk factors in high-risk patients, *Pharmacol. Res.* 65 (2012) 615-620.
- [4] C.C. Barron, J. Moore, T. Tsakiridis, G. Pickering, E. Tsiani, Inhibition of human lung cancer cell proliferation and survival by wine, *Cancer Cell. Int.* 14 (2014) 6-18.
- [5] M. Kampa, A. Hatzoglou, G. Notas, A. Damianaki, E. Bakogeorgou, C. Gemetzi, E. Kouroumalis, P.M. Martin, E. Castanas, Wine antioxidant polyphenols inhibit the proliferation of human prostate cancer cell lines, *Nutr. Cancer* 37 (2000) 223-233.
- [6] V.R. Drel, N. Sybirna, Protective effects of polyphenolics in red wine on diabetes associated oxidative/nitrative stress in streptozotocin-diabetic rats, *Cell Biol. Int.* 34 (2010) 1147-1153.
- [7] T. Ahmed, S. Javed, S. Javed, A. Tariq, D. Šamec, S. Tejada, S.F. Nabavi, N. Braidy, S.M. Nabavi, Resveratrol and Alzheimer's disease: mechanistic insights, *Mol. Neurobiol.* (2016) 1-14.
- [8] C. Stockly, P. Teissedre, M. Boban, C. Di Lorenzo, P. Restani, Bioavailability of wine-derived phenolic compounds in humans: a review, *Food Funct.* 3 (2012) 995-1007.
- [9] P. Cabras, E. Conte, Pesticide residues in grapes and wine in Italy, *Food Addit. Contam.* 18 (2001) 880-885.
- [10] E. Menegola, M.L. Broccia, F. Di Renzo, V. Massa, E. Giavini, Study on the common teratogenic pathway elicited by the fungicides triazole-derivatives, *Toxicol. Vitr.* 19 (2005) 737-748.

- [11] A. Pfohl-leszkowicz, Ochratoxin A and aristolochic acid involvement in nephropathies and associated urothelial tract tumours, *Arh. Hig. Rada. Toksikol.* 60 (2009) 465-483.
- [12] S. Abid, W. Hassen, A. Achour, H. Skhiri, K. Maaroufi, F. Ellouz, E. Creppy, H. Bacha, Ochratoxin A and human chronic nephropathy in Tunisia: is the situation endemic?, *Hum. Exp. Toxicol.* 22 (2003) 77-84.





II. INTRODUCCIÓN





II.A. COMPUESTOS ESTUDIADOS



1. PESTICIDAS

1.1. Definición y clasificación

El Código Internacional de Conducta para la Distribución y Utilización de Plaguicidas de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (*Food and Agriculture Organization*, FAO) define un plaguicida o pesticida como “cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo las enfermedades humanas o de los animales, las especies no deseadas de plantas o animales que interfieren en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera o alimentos para animales, o que pueden administrarse a los animales para combatir insectos, arácnidos u otras plagas en o sobre sus cuerpos”. Esta definición incluye las sustancias destinadas a utilizarse como reguladoras del crecimiento de las plantas, defoliantes, desecantes, agentes para evitar la caída prematura de la fruta o para reducir la densidad de la fruta, así como las sustancias aplicadas a los cultivos antes o después de la cosecha para proteger el producto contra su deterioro durante el almacenamiento y transporte [1].

Según su uso, los pesticidas pueden clasificarse en cuatro clases que incluyen herbicidas, fungicidas, insecticidas y rodenticidas, además de otros subgrupos basados en plagas específicas como larvicidas, miticidas, acaricidas, nematocidas o silvicidas. También se incluyen como pesticidas, ya que se utilizan para el control de plagas, los atrayentes y los repelentes, aunque su finalidad no sea provocar la muerte del organismo que causa la plaga [2]. En esta Tesis se han considerado compuestos de las tres primeras clases de pesticidas enumeradas anteriormente. Estos productos se aplican en la vid para evitar la aparición de enfermedades y, por lo tanto, una disminución de la producción de uva y como resultado, la disminución de la calidad del vino obtenido.

Una vez aplicados en la planta, los pesticidas se pueden clasificar en tres grupos atendiendo a su modo de acción:

- **Erradicantes o de contacto:** Tras su aplicación, estos productos permanecen en la superficie de la planta donde son aplicados por lo que, en caso de lluvia, pierden su acción.
- **Sistémicos:** Estos productos se aplican en la planta o en el suelo y transcurrido un tiempo de acción, penetran en el interior de esta o se absorben por la raíz y se incorporan a su savia transportándose a todas las partes de la planta.
- **Penetrantes:** Después de su aplicación en una zona de la planta, este tipo de pesticidas sólo penetran en la zona en la que se han aplicado. No se incorporan a la savia y, por tanto, no se distribuyen por toda la planta.

1.1.1. FUNGICIDAS

1.1.1.1. Definición, estructura y propiedades

Los fungicidas son productos fitosanitarios que actúan sobre hongos patógenos, organismos parásitos capaces de producir enfermedades criptogámicas. Pueden aplicarse en el suelo, las semillas y las plantas, antes o después de la cosecha, para evitar la acción de hongos que subsisten a expensas de organismos vegetales, pudiendo reducir considerablemente los rendimientos agrícolas, así como tener consecuencias negativas para la salud de los consumidores y otros seres vivos del medio.

Aunque los primeros fungicidas utilizados fueron de origen inorgánico, a base de azufre o iones metálicos como el cobre, estaño, cadmio y mercurio, en la actualidad los más empleados son los orgánicos, debido a la acumulación de metales en las capas superficiales del suelo, especialmente en viñedo tras un uso continuado de fungicidas de naturaleza inorgánica, afectando negativamente en la fertilidad del suelo [3]. A continuación, se indican en la Figura II.A.1 los fungicidas orgánicos estudiados en este trabajo, clasificándolos según la familia química a la que pertenecen.

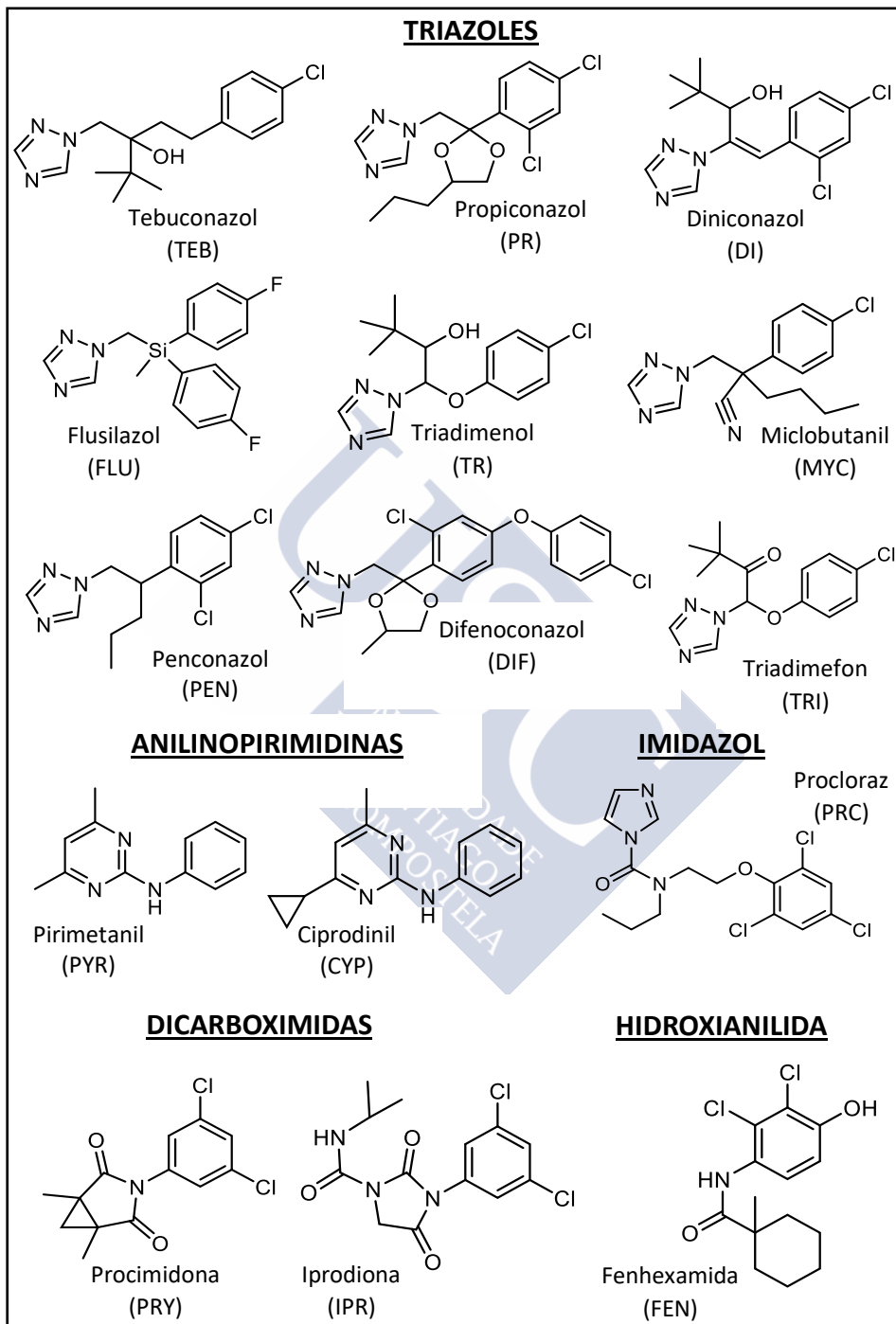


Figura II.A.1: Estructura de los fungicidas estudiados en esta Tesis.

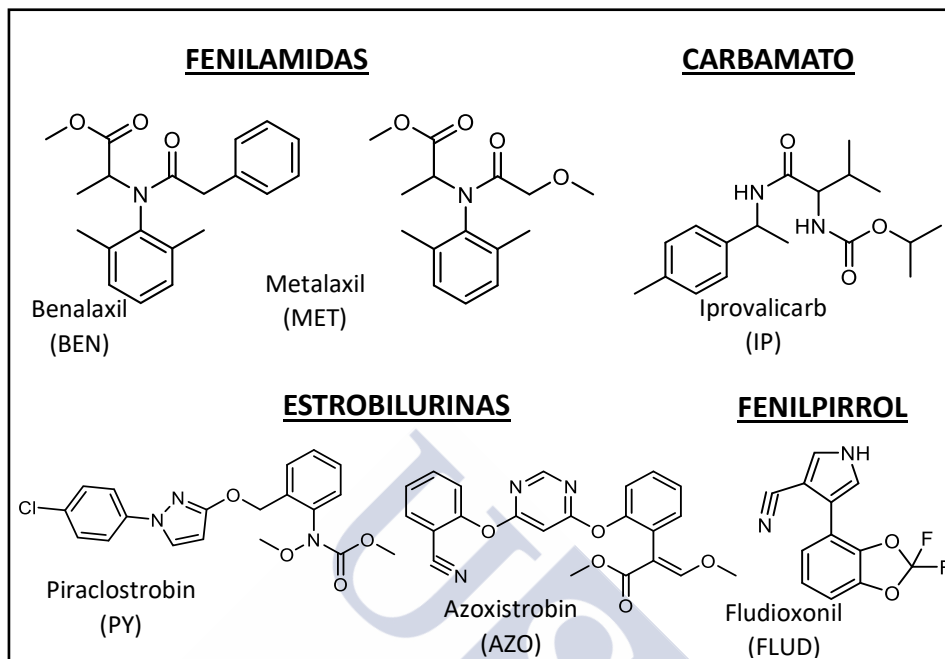


Figura II.A.1 cont: Estructura de los fungicidas estudiados en esta Tesis.

En la Tabla II.A.1 se indican las propiedades físico-químicas más relevantes de los fungicidas indicados anteriormente. Se trata de compuestos térmica y químicamente estables con valores de presión de vapor comprendidos entre 1.89×10^{-5} y 1.67×10^{-13} torr y con carácter lipofílico ($\log K_{ow}$ 1.76 - 5.68). Estos compuestos presentan un grupo básico con valores de pK_a inferiores al pH de las muestras de vino utilizadas (3.5 - 3.9), por lo que estas especies se encontrarán fundamentalmente en su forma neutra, excepto en el caso de PYR, CYP y PRC con valores ligeramente superiores a los del pH de la muestra. En el caso de las especies anfóteras, tienen un grupo ácido con valores de pK_a (7.73 - 13.70) superiores al pH de la muestra y su grupo básico con valores de pK_a (-9.13 - 3.27) inferiores, también están en su forma neutra en el momento de su extracción.

Tabla II.A.1: Propiedades físico-químicas de los fungicidas seleccionados recogidas en la base de datos *SciFinder*.

Fungicida	CAS	Peso Molecular	log K _{ow}	pK _a (25 °C)	Punto de ebullición (°C) (760 torr)	Presión de vapor (torr)	Solubilidad (g L ⁻¹) (pH 7, 25 °C)
PY	17513-18-0	387.82	3.14	-0.23 ^b	501	3.59 x 10 ⁻¹⁰	0.012
AZO	131860-33-8	403.39	5.68	-0.93 ^b	581	1.67 x 10 ⁻¹³	2.5 x 10 ⁻⁴
PEN	66246-88-6	284.18	4.64	2.80 ^b	415	4.18 x 10 ⁻⁷	4.0 x 10 ⁻³
PR	60207-90-1	342.22	3.65	2.94 ^b	180	2.26 x 10 ⁻⁹	0.010
DI	83657-24-3	326.22	4.34	12.89 ^a /2.19 ^b	501	7.35 x 10 ⁻¹¹	2.5 x 10 ⁻³
FLU	85509-19-9	315.39	3.70	2.91 ^b	393	5.5 x 10 ⁻⁵	0.017
TR	55219-65-3	295.76	2.97	13.29 ^a /2.16 ^b	465	1.84 x 10 ⁻⁹	3.7 x 10 ⁻⁴
MYC	88671-89-0	288.78	3.07	2.30 ^b	208	7.82 x 10 ⁻⁹	0.015
TEB	107534-96-3	307.82	3.77	13.70 ^a /3.27 ^b	480	6.69 x 10 ⁻¹⁰	0.03
TRI	43121-43-3	293.75	2.73	1.41 ^b	442	5.26 x 10 ⁻⁸	0.071
DIF	119446-68-3	406.26	4.16	2.94 ^b	547	5.09 x 10 ⁻¹²	7.7 x 10 ⁻⁴
BEN	71626-11-4	325.40	3.26	1.52 ^b	469	5.80 x 10 ⁻⁹	2.4 x 10 ⁻⁴
MET	57837-19-1	279.33	1.76	1.41 ^b	296	2.00 x 10 ⁻⁶	3.4
PYR	53112-28-0	199.25	2.56	4.41 ^b	363	1.89 x 10 ⁻⁵	0.11
CYP	121552-61-2	225.29	3.01	4.22 ^b	406	8.42 x 10 ⁻⁷	0.015
IP	140923-17-7	320.43	4.09	11.4 ^a /-0.86 ^b	498	4.80 x 10 ⁻¹⁰	0.045
PRY	32809-16-8	284.14	2.93	-2.67 ^b	478	2.70 x 10 ⁻⁹	5.1 x 10 ⁻³
IPR	36734-19-7	330.17	3.10	9.19 ^a /-2.23 ^b	545	1.51 x 10 ⁻¹⁰	0.016
FLUD	131341-86-1	248.18	3.59	14.10 ^a /-9.13 ^b	420	2.83 x 10 ⁻⁷	0.011
PRC	67747-09-5	376.67	4.59	4.84 ^b	209	4.02 x 10 ⁻¹⁰	0.020
FEN	126833-17-8	302.20	3.86	7.73 ^a /0.00 ^b	458	5.26 x 10 ⁻⁹	0.026

^agrupo ácido, ^bgrupo básico

1.1.2. INSECTICIDAS

1.1.2.1. Definición, estructura y propiedades

Los insecticidas son productos que se aplican para matar insectos por medio de su acción química, física y biológica. Según su efecto sobre los insectos se pueden agrupar en tres tipos: estomacales, actuando a través de la ingesta de plantas sobre las que se ha aplicado el producto; de contacto, aplicando el insecticida directamente sobre el organismo y la superficie de la planta en la que se encuentra y fumigantes, que matan al insecto una vez penetran por las vías respiratorias [4].

Los primeros insecticidas que se utilizaron fueron de origen natural, azufre, cobre y compuestos extraídos de plantas o flores como la nicotina, la rotenona y el piretro. Posteriormente, comenzaron a utilizarse insecticidas de síntesis, siendo el DDT (dicloro

difenil tricloroetano, 1,1,1-tricloro-2,2-bis(4-clorofenil)-etano) el primero en sintetizarse en el año 1939, y que actualmente está prohibido ya que, una vez aplicado, persiste en el medio ambiente durante mucho tiempo sin descomponerse a sustancias inertes, lo que representa un riesgo ambiental [5].

Actualmente existe una amplia gama de productos químicos utilizados como agentes de control de plagas de insectos, pero, debido a que los ciclos de vida de los insectos son muy cortos o, a mutaciones que se producen en ellos, muchas especies han desarrollado resistencia a estos productos o incluso, la presencia de insecticidas favorece su reproducción. Debido a esto y a la búsqueda de nuevos productos con una menor persistencia en el medio ambiente, se han investigado nuevos insecticidas, como es el caso de los **neonicotinoides**, compuestos sintetizados como modelo de la nicotina natural, que se caracterizan por actuar sobre el sistema nervioso central del insecto una vez penetran en él, causando un bloqueo irreversible de los receptores nicotínicos post-sinápticos de la acetilcolina [6,7].

En la Figura II.A.2 se indica la estructura de los insecticidas estudiados en este trabajo agrupados por la familia química a la que pertenecen. Sus propiedades físico-químicas se recogen en la Tabla II.A.2. Se trata de compuestos poco volátiles (presión de vapor 1.09×10^{-4} - 9.89×10^{-11} torr) y con elevado carácter lipofílico a excepción de los compuestos neonicotinoides con valores de $\log K_{ow}$ de 0.16 a 2.2. Como en el caso de los fungicidas, tienen valores de pK_a para el grupo básico por debajo del pH de la muestra (3.5 - 3.9), excepto Imidacloprid que es ligeramente superior (pK_a 4.80) y los pK_a del grupo ácido son mayores que el valor de pH, menos en el caso de Clotianidin (pK_a 2.76), por lo que en la etapa de extracción de la muestra estos compuestos se encontrarán en su forma neutra.

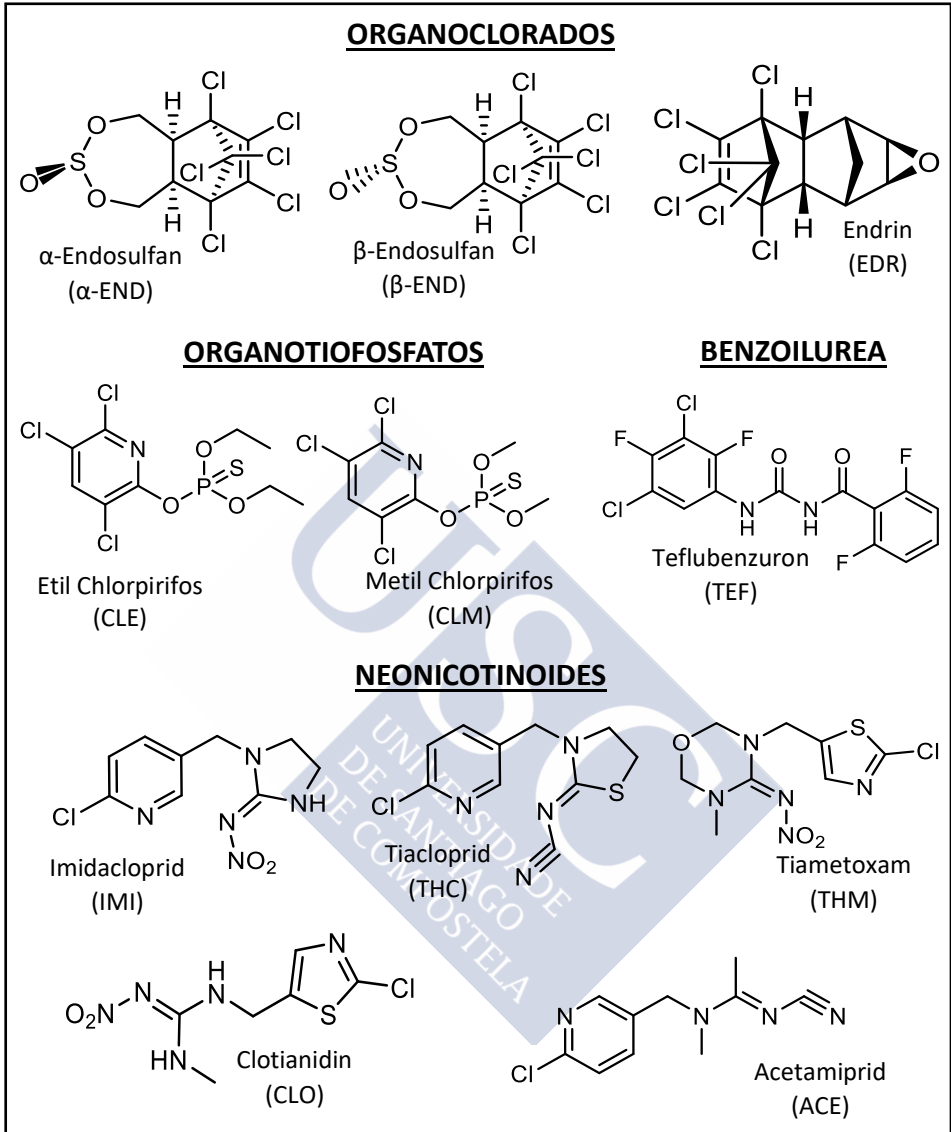


Figura II.A.2: Estructura de los insecticidas estudiados en esta Tesis.

Tabla II.A.2: Propiedades físico-químicas de los insecticidas seleccionados recogidas en la base de datos *SciFinder*.

Insecticida	CAS	Peso Molecular	log K _{ow}	pK _a (25 °C)	Punto de ebullición (°C) (760 torr)	Presión de vapor (torr)	Solubilidad (g L ⁻¹) (pH 7, 25 °C)
α-END	959-98-8	406.93	3.83	-5.50 ^b *	450	7.42 x 10 ⁻⁸	1.1 x 10 ⁻³
β-END	33213-65-9	406.93	3.83	-5.50 ^b *	450	7.42 x 10 ⁻⁸	1.1 x 10 ⁻³
EDR	72-20-8	380.91	4.48	-4.20 ^b	416	9.43 x 10 ⁻⁷	1.9 x 10 ⁻⁴
CLE	2921-88-2	350.59	5.00	-5.28 ^b	376	1.63 x 10 ⁻⁵	1.6 x 10 ⁻³
CLM	5598-13-0	322.53	3.99	-5.59 ^b	347	1.09 x 10 ⁻⁴	7.7 x 10 ⁻³
TEF	83121-18-0	381.11	5.02	8.16 ^a / ⁻ 1.61 ^b	513	9.89 x 10 ⁻¹¹	2.3 x 10 ⁻⁵
IMI	138261-41-3	255.66	0.33	7.16 ^a / ⁻ 4.80 ^b	442	5.07 x 10 ⁻⁸	2.8
THC	111988-49-9	252.72	2.20	0.01 ^b	423	2.30 x 10 ⁻⁷	0.048
THM	153719-23-4	291.71	0.16	0.99 ^b	486	1.36 x 10 ⁻⁹	0.44
CLO	210880-92-5	249.68	0.73	2.76 ^a / ⁻ 0.20 ^b	413	5.16 x 10 ⁻⁷	55
ACE	135410-20-7	222.67	1.55	-0.44 ^b	352	3.85 x 10 ⁻⁵	0.49

^agrupo ácido, ^bgrupo básico

* Valores obtenidos usando el software *ChemAxon*

1.1.3. HERBICIDAS

1.1.3.1. Definición, estructura y propiedades

Un herbicida es un producto que se utiliza para inhibir o interrumpir el desarrollo de plantas indeseadas en terrenos que han sido, o van a ser, cultivados. Dependiendo de su modo de acción en la planta una vez aplicados, pueden actuar como reguladores o inhibidores de crecimiento, inhibidores de procesos de la planta como la síntesis de pigmentos o la fotosíntesis o actuando sobre la estructura de esta como destructores de membranas celulares, provocando la muerte de la planta [8].

Los primeros herbicidas utilizados fueron sales inorgánicas como el sulfato de cobre, para el control de malezas de hoja ancha en cereales, hasta el año 1932, cuando se introdujo el primer herbicida orgánico, el DNOC (dinitro-o-cresol) y posteriormente el 2,4-D y el MCPA (ácido 2,4-diclorofenoxiacético y ácido 2-metil-4-clorofenoxiacético, respectivamente). En la actualidad se conocen aproximadamente 260 herbicidas agrupados en 70 familias químicas [9]. En este trabajo se ha incluido, dentro del listado de fitosanitarios determinados en vino, el herbicida Trifluralin, considerado como un inhibidor de crecimiento

de especies herbáceas no deseadas. A continuación, se muestra la estructura de este compuesto en la Figura II.A.3.

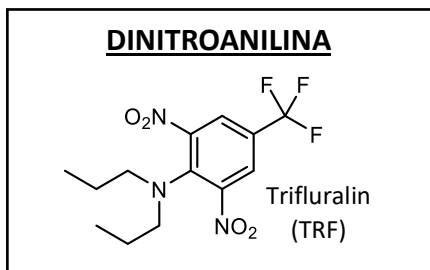


Figura II.A.3: Estructura del herbicida estudiado en esta Tesis.

En la Tabla II.A.3 se muestran las propiedades físico-químicas de Trifluralin. Se trata de un compuesto con carácter lipofílico ($\log K_{ow}$ 4.46) y poco volátil (Presión de vapor 1.21×10^{-5} torr). Posee un grupo básico con un valor de pK_a inferior al pH de la muestra por lo que, al igual que los fungicidas y los insecticidas descritos anteriormente, aparecerá en su forma neutra en la muestra.

Tabla II.A.3: Propiedades físico-químicas del herbicida seleccionado recogidas en la base de datos SciFinder.

Herbicida	CAS	Peso Molecular	$\log K_{ow}$	pK_a (25 °C)	Punto de ebullición (°C) (760 torr)	Presión de vapor (torr)	Solubilidad (g L ⁻¹) (pH 7, 25 °C)
TRF	1582-09-8	335.28	4.46	-1.45 ^b	140	1.21×10^{-5}	1.1×10^{-3}

^b grupo básico

1.2. Usos y aplicaciones

Anualmente se comercializan en la Unión Europea 400 mil toneladas de pesticidas, siendo España el país en el que más se utilizan, alcanzando el 20 % de las ventas europeas, seguido de Italia y Francia [10]. Según datos del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, el 44 % de los productos fitosanitarios comercializados en el marco nacional son fungicidas que se utilizan principalmente en el cultivo de la vid [11].

Debido a las condiciones climáticas adversas en algunas zonas de cultivo de la uva, es frecuente la aparición de enfermedades provocadas por insectos, hongos y malas hierbas

que pueden afectar negativamente el desarrollo de la vid generando a corto plazo pérdidas en el rendimiento del viñedo, así como en la calidad de la uva, y posteriormente del vino producido. Entre estas enfermedades provocadas por insectos destacan la polilla de la vid (*Lobesia botrana* y *Clysia ambiguella*) y los pulgones (*Eotetranychus carpini* y *Panoniclus ulmi*), y por hongos, el mildiu (*Plasmopora viticola*), el oidio (*Uncinula necator*) y el moho gris o *botrytis* (*Botrytis cinerea*). Algunas de las malas hierbas que afectan al viñedo son: el cenizo (*Chenopodium album* L.), la cerraja (*Sonchus Asper* L.) y la hierba mora (*Solanum Nigrum* L.) [12], por lo que, para controlar estos ataques es frecuente el uso de pesticidas tales como fungicidas, insecticidas y herbicidas.

Además de su uso en prácticas agrícolas, debido a las propiedades de los fungicidas e insecticidas, estos compuestos también se emplean como conservantes y protectores de la madera [13,14], en la fabricación de suelo de parques infantiles [15] y en el sector textil [16] para la desinfección y protección ante la posible aparición de plagas de hongos e insectos. También es frecuente su uso en productos de cuidado personal [17] y su uso veterinario [18–20] y, algunos compuestos pertenecientes a la familia química de los triazoles e imidazoles, como Fluconazol, Ketoconazol y Clotrimazol se utilizan como medicamentos para combatir enfermedades causadas por hongos en humanos y animales [21,22].

1.3. Toxicidad

El uso de pesticidas en agricultura produce un incremento de la producción, así como una mejora en la calidad de los productos agrícolas tales como frutas, verduras y cereales, pero, debido a malas prácticas en la aplicación de los productos fitosanitarios y a la dificultad para eliminarlos mediante el lavado o pelado de los alimentos, ya que los compuestos sistémicos se encuentran en la pulpa y el zumo de la fruta, es necesario regular su uso debido a que pueden afectar a la salud de los consumidores. Además de esto, el uso extensivo de estos productos en agricultura, puede derivar en un problema medioambiental por la contaminación de fitosanitarios en aguas superficiales y sedimentos [23,24], afectando

a organismos acuáticos presentes en el medio [24], lo que podría ocasionar daños en la salud de los seres humanos tras la ingesta de estos organismos.

La Organización Mundial de la Salud (*World Health Organization*, WHO), recomienda la clasificación de los pesticidas en función de su toxicidad, expresada en DL50 (dosis letal para matar al 50% de la población por vía oral o dérmica en ensayos realizados con ratas, atendiendo a la principal vía de acción para cada compuesto), en extremadamente peligrosos (IA), altamente peligrosos (IB), moderadamente peligrosos (II), ligeramente peligrosos (III) y que no presentan una peligrosidad en uso normal (U) [25]. Según esto, los compuestos que se han estudiado en esta Tesis pertenecen al grupo de pesticidas de toxicidad moderada o baja.

Dentro del grupo de los fungicidas, los más estudiados son los compuestos triazólicos e imidazólicos que actúan sobre los hongos inhibiendo la enzima lanosterol 14 α -demetilasa (LDM), reguladora de la síntesis de ergosterol, esencial para la formación de la membrana celular de los hongos [26], pudiendo además interactuar con el sistema citocromo P450 (CYP) de mamíferos [27] inhibiendo las enzimas de la síntesis de esteroides, actuando como disruptores endocrinos [28,29], causando problemas hepáticos y teniendo efectos teratogénicos en humanos [30,31]. Además, se ha demostrado que este tipo de pesticidas afectan al sistema nervioso central causando hiperactividad [32].

En cuanto a los insecticidas, en la década de los 70 la mayoría de los compuestos organoclorados fueron prohibidos debido a su contribución a muchas enfermedades. Además, debido a que su descomposición es lenta, con una vida media de aproximadamente 75 años para la mayoría de ellos, estos compuestos todavía están presentes en el medio ambiente [33]. Los síntomas de una intoxicación aguda por estos pesticidas son la aparición de temblores, mareos, náuseas, dolor de cabeza y problemas respiratorios [33], mientras que también están asociados a enfermedades crónicas tales como cáncer [34,35], daños neurológicos [36] y enfermedades de Parkinson [37] y Alzheimer [38].

Los neonicotinoides son insecticidas que actúan sobre las capacidades de procesamiento de información de los invertebrados, afectando a rutas neuronales que difieren de la de los vertebrados, por lo que son considerados menos tóxicos para las

especies vertebradas [39,40]. En los últimos años, debido a estudios realizados en laboratorio para exposiciones a corto plazo [41,42], se ha relacionado el uso de este tipo de insecticidas con el descenso en la población de las abejas, así como de otros insectos importantes en el proceso de polinización de las flores, que resulta vital para nuestra alimentación y para la biodiversidad. Finalmente, en el año 2016, estos estudios fueron confirmados por Woodcock y col. [43] con el análisis de su distribución en 62 especies de abejas silvestres durante 18 años en distintas zonas de cultivo tratadas con neonicotinoides. Además, debido a que se trata de compuestos muy persistentes en el suelo y en el agua, otros organismos del medio pueden verse expuestos a estos compuestos [44–46].

1.4. Legislación

En general, los pesticidas se aplican para evitar que plagas de insectos, hongos o la presencia de malas hierbas afecten a los cultivos dando lugar a pérdidas en la producción, y, por tanto, generar pérdidas económicas. Pero, en ocasiones, estos compuestos se aplican en exceso impidiendo que las plantas puedan asimilar los nutrientes que reciben, alterando la calidad de los cultivos y pudiendo dar lugar a problemas de salud en los consumidores tras la ingesta de alimentos contaminados, así como tener consecuencias ambientales negativas.

Para evitar estos efectos negativos, la Unión Europea establece unos niveles máximos permitidos (*Maximum residue limit*, MRL) en varias frutas y verduras, determinados en función de las características toxicológicas de cada compuesto, prácticas agrícolas, ingesta diaria, plazo de seguridad, etc. Actualmente se aplica el reglamento N° 1107/2009 [47] relativo a la comercialización de productos fitosanitarios, derogando las anteriores directivas 91/414/CEE [48] y 79/117/CEE [49]. Para regular el MRL de cada pesticida, se aplica el reglamento (EC) N° 396/2005, modificando estos valores para cada uno de ellos según los reglamentos posteriores indicados en la Tabla II.A.4.

Actualmente, la presencia de pesticidas en vino no está regulada por la Unión Europea, aunque, la Organización Internacional de la Viña y el Vino (*Organisation Internationale de la Vigne et du Vin*, OIV) sugiere como MRL la décima parte del valor

establecido para uva de vinificación. Además, algunos países europeos como Italia y Suiza han establecido MRLs para alguno de estos compuestos en vino.

En la Tabla II.A.4 se recogen los MRL de la UE para uva de vinificación con la regulación que los establece y los MRL para vino según la legislación italiana [50] y suiza [51], para los compuestos incluidos en esta Tesis:

Tabla II.A.4: Reglamento que establece los MRL de pesticidas en uva y valores de MRL en uva y vino según la legislación italiana y suiza.

Pesticida	MRL uva UE (mg kg ⁻¹)	Reglamento	MRL vino Italia (µg mL ⁻¹)	MRL vino Suiza (µg mL ⁻¹)
PY	2.0	Reg (EU) N° 1016/2017	-	-
AZO	3.0	Reg (EU) N° 171/2017	0.5	-
PEN	0.2	Reg (EU) N° 401/2015	-	-
PR	0.3 ^a	Reg (EU) N° 626/2017	-	-
DI	0.01	Reg (EU) N° 1317/2013	-	-
FLU	0.01	Reg (EU) N° 703/2014	-	-
TR	2.0 ^b	Reg (EC) N° 627/2017	-	0.5
MYC	1.0	Reg (EU) N° 567/2016	0.1	-
TEB	1.0	Reg (EU) N° 626/2017	0.5	0.3
TRI	2.0 ^b	Reg (EC) N° 627/2017	-	0.5
DIF	3.0	Reg (EU) N° 626/2017	-	-
BEN	0.3	Reg (EU) N° 520/2011	-	-
MET	1.0	Reg (EU) N° 1164/2017	0.2	-
PYR	5.0	Reg (EU) N° 626/2017	2	-
CYP	3.0	Reg (EU) N° 626/2017	0.5	-
IP	2.0	Reg (EU) N° 777/2013	1	-
PRY	0.01	Reg (EU) N° 1096/2014	0.5	-
IPR	20.0	Reg (EU) N° 400/2015	2	-
FLUD	4.0	Reg (EU) N° 1902/2016	0.5	-
PRC	0.05 ^c	Reg (EU) N° 520/2011	-	-
FEN	15.0	Reg (EU) N° 1200/2015	1.5	-
α-END	0.05 ^d	Reg (EU) N° 310/2011	-	-
β-END	0.05 ^d	Reg (EU) N° 310/2011	-	-
EDR	0.01	Reg (EC) N° 149/2008	-	-
CLE	0.5	Reg (EU) N° 60/2016	-	-
CLM	0.2	Reg (EC) N° 839/2008	-	-
TEF	0.01	Reg (EU) N° 71/2016	0.01	-
IMI	1.0	Reg (EU) N° 491/2014	-	-
THC	0.01	Reg (EU) N° 1355/2016	-	-
THM	0.4	Reg (EU) N° 671/2017	-	-
CLO	0.7	Reg (EU) N° 671/2017	-	-
ACE	0.5	Reg (EU) N° 626/2017	-	-
TRF	0.01	Reg (EU) N° 552/2015	-	-

^asuma de isómeros; ^bsuma de TR y TRI; ^csuma con sus metabolitos; ^dsuma de α-END y β-END

1.5. Niveles de pesticidas en vino

La mayor parte de la producción de uva se destina a la elaboración de vino por lo que, los pesticidas que se aplican para aumentar la calidad de la producción, pueden no ser eliminados completamente en el proceso de vinificación y transferirse al vino. Por tanto, es importante conocer como evoluciona la concentración de estos compuestos a lo largo de las diferentes etapas del proceso de vinificación.

Los factores que afectan a la transferencia de productos fitosanitarios al vino dependen de las condiciones meteorológicas de la zona de cultivo y del tiempo transcurrido entre la aplicación de pesticidas y la recogida de la uva [52]. Durante el proceso de vinificación, algunos compuestos se eliminan de forma significativa por su adsorción en los residuos sólidos y las lías como en el caso de MYC y CYP y su degradación en medio ácido o durante la fermentación del vino por el uso de levaduras, evitando así su paso al vino [53,54]. Sin embargo, otros pesticidas como MET y PYR no se degradan por ninguno de estos procesos, transfiriéndose al vino en porcentajes muy elevados [53].

La forma de elaboración del vino, con o sin maceración, y el tipo de maceración influye también en la variación de los niveles de pesticidas en vino, de manera que se ha descrito una disminución de FLUD cuando el proceso se realiza sin maceración, mientras que en el caso de PYR, los valores son más bajos al utilizar una larga maceración y para CYP, con maceración carbónica [54]. La adición de clarificadores como el carbón, la caseína y la bentonita también pueden disminuir los niveles de pesticidas en vino [55].

A continuación, se presentan en la Tabla II.A.5 los factores de transferencia de diferentes pesticidas desde la uva al vino, recogidos de diferentes artículos científicos. Estos porcentajes pueden variar dependiendo de los factores indicados anteriormente en relación a las operaciones de vinificación. En la Tabla II.A.6 se resumen los niveles de pesticidas en vino descritos en la bibliografía.

Tabla II.A.5: Porcentajes de transferencia para diferentes pesticidas desde la uva al vino.

Pesticida	Factor de transferencia (%)	Referencia
PY	<2.0	[56]
AZO	22.0	[57]
PEN	5.9	[56]
PEN	6.0	[57]
PR	29.0	[58]
MYC	<4.0	[58]
TEB	52.3	[59]
TEB	20.0	[60]
BEN	4.7	[56]
MET	70.3	[61]
MET	90.0	[60]
PYR	90.2	[59]
CYP	0.6	[57]
CYP	1.4	[56]
IP	55.8	[56]
PRY	3.6	[60]
PRY	5.3	[57]
FLUD	4.4	[56]
FEN	65.0	[60]
CLE	1.0	[61]
CLM	19.0	[62]
IMI	38.0	[57]
ACE	43.0	[57]

Tabla II.A.6: Residuos de pesticidas en vino.

Pesticida	Tipo de vino	Número de muestras	Incidencia (%)	Rango de concentraciones (ng mL ⁻¹)	Referencia
MYC	Vino tinto	4	75	0.35 - 1.12	[63]
CYP	Vino tinto	47	4.2	70.0 - 86.0	[64]
MET	Vino tinto	47	6.4	79.0 - 148.0	[64]
AZO	Vino tinto	32	25	0.1 - 2.19	[65]
PEN	Vino tinto	47	2.1	146.0	[64]
TEB	Vino tinto	4	25	0.43	[63]
BEN	Vino tinto	32	47	0.02 - 0.32	[65]
IP	Vino tinto	8	25	4.4 - 50.0	[66]
IMI	Vino tinto	47	2.1	66.0	[64]
FLUD	Vino tinto	32	12.5	0.35 - 1.36	[65]
MET	Vino blanco	7	85.7	0.96 - 30.2	[63]
PRY	Vino blanco	21	23.8	0.37 - 8.32	[67]
IP	Vino blanco	9	66.7	3.6 - 110.0	[66]
CYP	Vino blanco	21	90.4	0.13 - 32.2	[67]
END	Vino blanco	15	6.7	7.4	[68]
BEN	Vino blanco	9	25	2.2 - 12.9	[66]
AZO	Vino blanco	15	66.7	0.41 - 65.3	[68]

2. MICOTOXINAS. OCRATOXINA A

2.1. Definición, estructura y propiedades

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por la presencia de hongos, capaces de contaminar alimentos o piensos, así como la materia prima utilizada para su elaboración, originando diversas enfermedades y trastornos denominados micotoxicosis, resultando tóxicos para el hombre y/o los animales [69]. Las micotoxinas son objeto de interés mundial debido a que generan importantes pérdidas económicas que acarrearán sus efectos sobre el comercio nacional e internacional, la productividad de los animales y la salud de las personas. A continuación, en la Tabla II.A.7 se indican las micotoxinas consideradas de importancia mundial, de las que se ha demostrado su capacidad para tener efectos altamente negativos sobre la salud de las personas y la productividad de los animales en diversos países [70].

Tabla II.A.7: Hongos y micotoxinas de importancia mundial.

Especie de hongo	Micotoxinas producidas
<i>Aspergillus parasiticus</i>	Aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ y G ₂
<i>Aspergillus flavus</i>	Aflatoxinas B ₁ y B ₂
<i>Fusarium sporotrichioides</i>	Toxina T-2
<i>Fusarium graminearum</i>	Desoxivalenol Zearalenona
<i>Fusarium moniliforme</i>	Fumonisin B ₁
<i>Penicillium verrucosum</i>	Ocratoxina A
<i>Aspergillus ochraceus</i>	Ocratoxina A

En esta Tesis se ha estudiado la presencia de Ocratoxina A en muestras de vinos comerciales. Se trata de una micotoxina producida por varias especies de hongos pertenecientes a los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* como se ha indicado anteriormente. El crecimiento de estos hongos se produce en los tejidos muertos de las plantas causando el deterioro de éstas y de los frutos, incluyendo las uvas. Estos hongos son capaces de crecer en diversas condiciones de humedad, pH y temperatura, por ejemplo, el hongo *Penicillium* que produce OTA, crece en una amplia gama de temperaturas (4 - 31 °C), mientras que el *Aspergillus* requiere temperaturas más altas (12 - 39 °C), por lo que este suele ser el predominante en las zonas de climas más cálidos [71].

A continuación, se muestran en la Figura II.A.4 y Tabla II.A.8, respectivamente, la estructura de la Ocratoxina A y las propiedades físico-químicas de este compuesto. Se trata de un compuesto poco volátil (Presión de vapor 7.30×10^{-17} torr) y lipofílico ($\log K_{ow}$ 4.37) con una alta solubilidad en agua (23 g L^{-1}). En las muestras de vino analizadas con pH comprendidos entre 3.5 y 3.9, la OTA se puede encontrar en su forma neutra o aniónica debido a que el valor de pK_a de su grupo ácido está próximo al pH de los vinos.

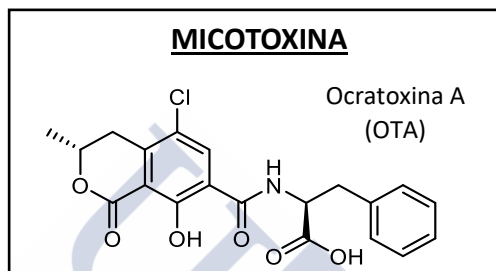


Figura II.A.4: Estructura de la Ocratoxina A.

Tabla II.A.8: Propiedades físico-químicas de la Ocratoxina A recogidas en la base de datos SciFinder.

Micotoxina	CAS	Peso Molecular	$\log K_{ow}$	pK_a (25 °C)	Punto de ebullición (°C) (760 torr)	Presión de vapor (torr)	Solubilidad (g L^{-1}) (pH 7, 25 °C)
OTA	303-47-9	403.81	4.37	3.29 ^a /-2.20 ^b	632	7.30×10^{-17}	23

^agrupo ácido, ^bgrupo básico

2.2. Toxicidad

La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (*International Agency for Research on Cancer*, IARC) ha clasificado la Ocratoxina A en el Grupo 2B como “Posible carcinógeno para el ser humano” [72] debido a que existen evidencias experimentales en animales. Esta clasificación fue realizada en el año 1993 pero, en la actualidad, debido a la nueva información que se dispone sobre la genotoxicidad de la OTA, como la formación de aductos OTA-ADN, su papel en el estrés oxidativo y la identificación de factores epigenéticos implicados en la carcinogénesis de la OTA [73–75], podría conllevar a una actualización de la

clasificación de este compuesto de 2B a 2A como “Probablemente carcinogénicos para los seres humanos” [76].

La OTA se ha descrito como una micotoxina nefrotóxica, considerándose como el principal agente causal de enfermedades renales como la Nefropatía Endémica de los Balcanes (*Balkan Endemic Nephropathy*, BEN) [77,78] y la Nefropatía Intersticial Crónica (*Chronic Interstitial Nephropathy*, CIN) [79], desencadenando en insuficiencias renales mortales. Además, presenta efectos neurotóxicos, ya que, el contacto con esta micotoxina puede afectar al desarrollo del cerebro, así como ser un factor perjudicial de la capacidad neurorregenerativa de éste [80]. También se han descrito en la bibliografía los efectos teratogénicos de este compuesto [81,82].

2.3. Legislación

Debido a la presencia de OTA en ciertos alimentos y su potencial efecto genotóxico y carcinogénico, la OTA fue evaluada a nivel europeo por el Comité Científico de la Alimentación de la Unión Europea (*Scientific Committee on Food*, SCF) en 1998 estableciendo de modo preventivo la dosis diaria tolerable entre 1.2 y 1.4 ng kg⁻¹ por peso corporal. Posteriormente, en el año 2006 la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (*European Food Safety Authority*, EFSA) adoptó un nuevo dictamen científico, estableciendo una ingesta semanal tolerable de 120 ng kg⁻¹ por peso corporal [83] y al año siguiente, el Comité Mixto FAO/WHO de Expertos en Aditivos Alimentarios (*Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*, JECFA) modificó la ingesta semanal a 112 ng kg⁻¹ por peso corporal [84].

Finalmente, y para proteger la salud pública, se estableció el Reglamento N° 1881/2006 en el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en productos alimenticios, fijando el valor máximo de 2 µg L⁻¹ de Ocratoxina A en vino [85]. Fuera de esta legislación quedan los vinos dulces con un porcentaje de etanol superior a 15 %.

2.4. Niveles de OTA en vino

La OTA es un compuesto estable que requiere de temperaturas por encima de 250 °C, durante varios minutos, para destruirse en los alimentos que la contienen, siendo difícil eliminarla por los procesos habituales de cocinado, por lo que tanto los alimentos crudos como los procesados pueden estar contaminados. Es frecuente encontrar esta micotoxina en productos vegetales como los cereales, los granos de café, el cacao, las especias y los frutos secos, pudiendo incrementar su concentración durante la etapa de almacenamiento. Además, se ha detectado en productos elaborados a base de cereales, el vino, la cerveza y el zumo de uva [86].

La presencia de la OTA en vino depende de las condiciones climáticas de las zonas de cultivo de uva, tales como la humedad y temperatura atmosféricas, el tipo de elaboración de vino y las condiciones de almacenamiento [87], siendo los vinos dulces los que presentan una mayor probabilidad de contaminación frente a los secos, debido a su elaboración a partir de uva pasa, secada directamente al sol después de la cosecha, aumentando su contenido de azúcar, lo que puede estimular la formación de OTA [88].

En la actualidad, se busca disminuir el contenido de OTA en vinos y mostos mediante la adición de adsorbentes en la etapa de vinificación, como carbón activado [89] o la modificación de las condiciones climáticas, evitando la exposición de la uva al sol, para reducir la formación de hongos mediante la etapa de secado [90,91]. En la Tabla II.A.9 se muestran los niveles de OTA descritos en la bibliografía.

Tabla II.A.9: Niveles de OTA en vino.

Tipo de vino	Número de muestras	Muestras positivas (%)	Rango de concentraciones (ng mL ⁻¹)	Referencia
Vino Dulce	16	50	0.3 - 7.3	[88]
Vino Dulce	5	100	0.05 - 2.3	[92]
Vino Tinto	21	76.2	0.04 - 0.71	[92]
Vino Blanco	26	88.4	0.04 - 0.56	[92]
Vino Tinto	10	10	0.63	[93]

3. ESTILBENOS

3.1. Definición, estructura y propiedades

Los estilbenos son metabolitos secundarios producidos por plantas en respuesta a condiciones de estrés, particularmente por infecciones de insectos, bacterias u hongos, debido a la exposición a radiación UV o a la presencia de ozono [94–96]. Son compuestos polifenólicos bioactivos con propiedades antioxidantes, siendo el Resveratrol el principal compuesto de este grupo, ya que se trata del más estudiado y del que mejor se conocen sus propiedades. Debido a los efectos beneficiosos del Resveratrol, se ha empleado para la fabricación de preparados medicinales en la medicina tradicional en países como India o China [97], aunque, su estructura química no se conoció hasta el año 1940, cuando fue aislado por primera vez de la raíz *Veratrum grandiflorum* [98].

En la actualidad, se han descrito compuestos análogos al Resveratrol con propiedades similares a las de éste. La estructura química de estos compuestos consiste en dos anillos aromáticos, en el que alguna de sus posiciones está ocupada por grupos hidroxilo, o bien grupos funcionales como metoxilos o glicósidos, unidos por un puente vinílico. Debido a esto, existen dos isómeros geométricos que aparecen de manera natural, siendo la reacción de isomerización *cis-/trans-* reversible [99] y la forma *trans* la predominante y de la que se describen sus beneficios en la salud tras su consumo. En la Figura II.A.5 se muestran las estructuras de estos compuestos.

En la Tabla II.A.10 se indican las propiedades físico-químicas de los estilbenos. Se trata de compuestos moderadamente lipofílicos con valores de $\log K_{ow}$ comprendidos entre 2.68 y 4.06, excepto PICE ($\log K_{ow}$ 0.41) debido a la polaridad del grupo glicósido. Los compuestos seleccionados son ligeramente ácidos ya que tienen pK_a comprendidos entre 9.17 y 9.96 por lo que se encontrarán en su forma neutra durante su extracción en muestras de vino con un pH entre 3.5 y 3.9. Además, son compuestos poco volátiles ya que tienen presiones de vapor bajas (1.15×10^{-7} - 5.08×10^{-21} torr).

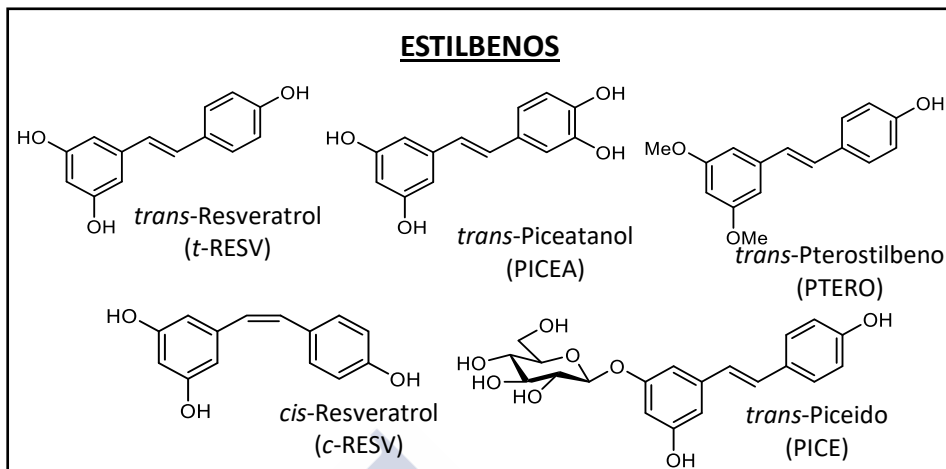


Figura II.A.5: Estructura de los estilbenos considerados en esta Tesis.

Tabla II.A.10: Propiedades físico-químicas de los estilbenos seleccionados recogidas en la base de datos *SciFinder*.

Estilbeno	CAS	Peso Molecular	log K_{ow}	pK _a (25 °C)	Punto de ebullición (°C) (760 torr)	Presión de vapor (torr)	Solubilidad (g L ⁻¹) (pH 7, 25 °C)
t-RESV	501-36-0	228.24	3.02	9.22 ^a	449.1	1.11 x 10 ⁻⁸	0.021
c-RESV	61434-67-1	228.24	3.02	9.22 ^a	449.1	1.11 x 10 ⁻⁸	0.021
PICEA	10083-24-6	244.24	2.68	9.17 ^a	507.3	6.51 x 10 ⁻¹¹	0.032
PTERO	537-42-8	256.30	4.06	9.96 ^a	420.4	1.15 x 10 ⁻⁷	0.069
PICE	27208-80-6	390.38	0.41	9.21 ^a	707.7	5.08 x 10 ⁻²¹	1.7

^a grupo ácido

3.2. Efectos y aplicaciones del consumo de estilbenos

Los estilbenos son compuestos ampliamente investigados, con creciente evidencia de sus beneficios en la salud de los consumidores. El Resveratrol, presente mayoritariamente en uva y en productos derivados como el vino, zumo o mosto, es el compuesto para el que se han descrito sus beneficios más ampliamente. Se ha reconocido como el agente responsable de la llamada *Paradoja Francesa*, mediante la que se relaciona el consumo moderado de bebidas alcohólicas, en especial vino, con la disminución del riesgo de los consumidores de sufrir patologías cardiovasculares [100].

Además, se ha descrito el carácter antioxidante [101] y anti-inflamatorio [102] tanto de Resveratrol como de sus análogos. Debido a estas propiedades, se ha concluido que los estilbenos pueden ayudar a prevenir o disminuir los efectos de enfermedades oculares [103,104]. También se han observado, en estudios *in vitro*, los efectos antiproliferativos de los estilbenos en las células tumorales [105–107]. Por todos estos efectos, se ha relacionado la ingesta o administración de estilbenos con el incremento de la esperanza de vida en diferentes organismos [108].

Se ha comprobado que estos compuestos juegan un papel importante como quimio, neuro y cardioprotectores debido a que participan en la regulación de los niveles de colesterol [109,110], así como en el tratamiento contra la obesidad [111,112].

Debido a estas propiedades, en la actualidad se comercializan suplementos de Resveratrol, obtenidos en la mayoría de los casos de la uva expuesta a radiación ultravioleta para aumentar su contenido en este compuesto [113]. En otros casos, estos suplementos se obtienen a partir de materiales vegetales ricos en derivados del Resveratrol conjugados con azúcares, por ejemplo PICE, que posteriormente se someten a una hidrólisis ácida para liberar el Resveratrol. Se han estudiado los efectos de estos suplementos tras su consumo diario, confirmado así que su uso aporta beneficios en la salud de pacientes con enfermedades cardiovasculares y ante el envejecimiento, reduciendo el estrés oxidativo sistémico y cutáneo [114,115].

3.3. Niveles de estilbenos en vino

Los estilbenos aparecen de manera natural en un gran número de plantas en situaciones de estrés, por lo que son denominados fitoalexinas. En la vid, su presencia fue descrita por primera vez en el año 1976 por Langcake y Pryce al observar Resveratrol en las hojas de la vid como respuesta a la infección de estas por *Botrytis cinerea* o, al irradiar las hojas de vid sanas con luz ultravioleta [94]. Además de la presencia de estilbenos en las hojas, se ha descrito que estos compuestos aparecen también en el tallo, semillas y en la piel de la uva, transfiriéndose al vino en el proceso de vinificación [116,117].

La presencia de estilbenos y otros compuestos polifenólicos en vino está determinada por varios factores que pueden ser ambientales, tales como las condiciones del suelo, el clima de la zona de cultivo, la madurez o variedad del fruto [118] y el tipo de técnica de vinificación empleada, de manera que los vinos que resulten de procesos de maceración más prolongados tendrán niveles más altos de estilbenos. Por este motivo, en los vinos tintos los niveles de polifenoles son superiores a los que se encuentran en vino blanco. En el caso de los tintos, durante el proceso de vinificación, el zumo de la uva se fermenta con las partes sólidas durante varios días, mientras que, en el proceso de fermentación del vino blanco, la parte sólida de la uva se retira inmediatamente después de su prensado. Además, otros factores importantes que afectan a la concentración de estos compuestos son la temperatura y el tiempo de almacenaje del vino [119].

En la actualidad, debido a los efectos beneficiosos de estos compuestos en la salud, se están desarrollando nuevas técnicas de vinificación para enriquecer el vino con estilbenos, especialmente con Resveratrol. Para esto, la adición de agentes antimicrobianos al vino como sulfitos, que pueden presentar además riesgos hepáticos, se sustituye por la adición de resveratrol [120], o por la de levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*, favoreciendo como resultado, el incremento de Resveratrol en el vino [121].

En la Tabla II.A.11 se indican los niveles que se han detectado para los compuestos seleccionados para esta Tesis. En el caso de Pterostilbeno, no es frecuente su detección ya que, los niveles existentes son relativamente bajos en uva y, además, su carácter lipófilo ($\log K_{ow}$ 4.06) parece limitar su transferencia desde la piel de la uva al vino.

Tabla II.A.11: Niveles de estilbenos en vino.

Estilbeno	Tipo de vino	Número de muestras	Incidencia (%)	Rango de concentraciones (ng mL ⁻¹)	Referencia
t-RESV	Vino tinto	6	100	376 - 776	[122]
t-RESV	Vino tinto	9	100	137 - 1800	[123]
t-RESV	Vino tinto	24	96	278 - 50200	[124]
t-RESV	Vino tinto	5	100	442 - 2510	[125]
t-RESV	Vino tinto	19	100	630 - 3390	[126]
t-RESV	Vino blanco	6	100	3.4 - 150	[123]
t-RESV	Vino blanco	1	100	37	[125]
t-RESV	Vino blanco	3	0	n.c.	[126]
c-RESV	Vino tinto	6	100	119 - 209	[122]
c-RESV	Vino tinto	5	100	35 - 163	[125]
c-RESV	Vino tinto	19	74	480 - 4930	[126]
c-RESV	Vino blanco	1	100	28	[125]
c-RESV	Vino blanco	3	60	520 - 910	[126]
PICE	Vino tinto	19	100	480 - 9310	[126]
PICE	Vino blanco	3	33	470	[126]
PICEA	Vino tinto	19	89	540 - 1800	[126]
PICEA	Vino blanco	3	0	n.d.	[126]

n.d., no detectado

n. c., no cuantificado



II.B. METODOLOGÍA DE PREPARACIÓN DE MUESTRA



1. EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

La extracción líquido-líquido (*Liquid-Liquid Extraction*, LLE) ha sido la técnica de referencia empleada para la extracción de diversas familias de compuestos orgánicos en muestras acuosas, pero, debido a las dificultades que se han experimentado al utilizar esta técnica como son: la exposición a grandes volúmenes de disolventes orgánicos, la formación de emulsiones, la excesiva manipulación de muestra y además, la gran cantidad de material de vidrio de elevado coste que se debe emplear en el proceso de extracción, otras técnicas han experimentado un mayor desarrollo e implementación para minimizar estos problemas como es el caso de la extracción en fase sólida.

La extracción en fase sólida (*Solid-Phase Extraction*, SPE) es un método versátil y selectivo de preparación de muestra que consiste en la extracción de los analitos de una muestra líquida por adsorción en una fase sólida, seguida de la elución de estos analitos con un disolvente apropiado para el análisis instrumental. Se trata de una técnica desarrollada como resultado de la búsqueda de una alternativa a la LLE, siendo aplicada experimentalmente por primera vez a finales de los años 40 [127], conduciéndose a su uso generalizado cuando la casa comercial *Waters Corporation* introdujo los cartuchos y las columnas desechables, preenvasados comercialmente, que contenían adsorbentes de sílice, a partir de mediados de los años 70. En el año 1982 fue cuando se acuñó el término “extracción en fase sólida” por los empleados de la *J.T. Baker Company* [128].

Además de la reducción de la gran cantidad de disolventes orgánicos que se utilizan con LLE, con el uso de SPE se persiguen dos objetivos principales:

- La concentración de los analitos antes de su análisis instrumental, llevándose a cabo mediante el paso de grandes volúmenes de muestra a través de la fase sólida, con el uso de pequeños volúmenes de disolvente de elución o bien, con la elución de los analitos con disolventes volátiles que se puedan concentrar fácilmente.

- La limpieza de los extractos obtenidos, ya que, aunque se concentren los analitos, en el extracto final también pueden estar presentes compuestos interferentes que alteren la determinación de estos analitos [129].

Para ello, es importante optimizar el proceso de extracción, siendo los puntos clave los que se indican a continuación [130]:

- La selección apropiada de la fase adsorbente para retener al analito de interés.
- La modificación del pH para manipular el analito y/o determinados componentes de la muestra en la forma iónica o neutra deseada.
- La selección de un disolvente de elución apropiado según la naturaleza de los analitos y el adsorbente.

1.1. Etapas del proceso

En la Figura II.B.1 se muestran las etapas de SPE, que se enumeran a continuación [131]:

- **Acondicionamiento del adsorbente.** En esta etapa, se pasa un disolvente o mezcla de disolventes, generalmente con los que se va a llevar a cabo la elución de los analitos, a través de la fase sólida para humedecer el material empaquetado y solvatar los grupos funcionales del adsorbente con el fin de prepararlo para la adición de la muestra.
- **Carga de la muestra o retención.** La muestra se hace pasar por la fase sólida por gravedad, bombeo, aspiración por vacío o por un sistema automatizado, dependiendo del dispositivo de fase sólida empleado, aunque esta velocidad no debe ser muy alta para facilitar la retención de los analitos en el adsorbente.
- **Lavado.** Se hace pasar un disolvente a través de la fase sólida para eliminar posibles interferencias y, en ocasiones, favorecer la retención de los analitos en el adsorbente.

- **Secado** de la fase sólida con el fin de eliminar restos de muestra o disolvente de lavado para su posterior elución. Este proceso se suele hacer con una corriente de nitrógeno o aplicando vacío.
- **Elución de los analitos**. Se utiliza un disolvente adecuado, capaz de romper la interacción entre los analitos y la fase sólida, mientras que las interferencias se mantendrán retenidas.

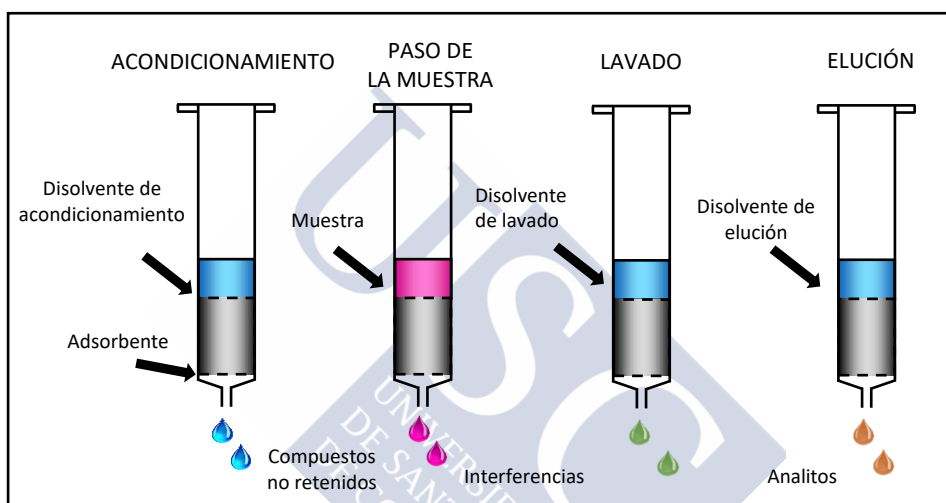


Figura II.B.1: Esquema del proceso de SPE.

1.2. Formatos y dispositivos comerciales

Los dispositivos de SPE más comunes son los **cartuchos** debido al gran número de adsorbentes disponibles comercialmente en este formato y a su fácil acoplamiento con dispositivos existentes en el laboratorio como los colectores de vacío, que facilitan la elución de los analitos, o al fácil acoplamiento entre cartuchos. Consisten en el cuerpo de una jeringa, en el que el adsorbente se encuentra empaquetado entre dos fritas de polipropileno (PP), Teflón o un prefiltro de lana de vidrio. El rango de volúmenes del cartucho de SPE puede oscilar entre 1 y 25 mL, y la masa del adsorbente empaquetado, desde 50 mg a 10 g, aunque para algunas aplicaciones analíticas se emplean cantidades más pequeñas [131].

Otro formato de SPE son los **discos**, que son membranas formadas por una matriz inerte como Teflón, sobre la que se inmovilizan partículas de 8 a 12 μm de adsorbente. Debido a su estructura, se emplean para la extracción de analitos presentes en grandes volúmenes de muestra, como es el caso de las muestras ambientales. Los discos se comercializan en diferentes diámetros, de 4 a 90 mm, siendo el más empleado el de 47 mm [132].

Para algunas aplicaciones, como en el caso de análisis clínicos, se buscan formatos que contengan un volumen y masa de adsorbente más pequeños, debido a la poca cantidad de muestra de la que se dispone. Esto también permite reducir la cantidad de disolventes empleados en la etapa de acondicionamiento y elución de los adsorbentes, reduciéndose además el riesgo de obtener impurezas aportadas en la etapa de concentración de un gran volumen de disolvente y como resultado, se reducirá el tiempo de preparación de la muestra [133]. En este caso, se utilizan dispositivos que contengan unos pocos miligramos de adsorbente como los **microdiscos**, haciendo posible la desorción de los analitos, y de ser necesaria su derivatización, en el mismo vial de auto-muestreo que se vaya a utilizar para la inyección en el sistema de análisis, por lo que se eliminan los tediosos pasos de preparación de muestra; las **puntas de pipeta**, donde una pequeña cantidad de adsorbente se coloca entre dos fritas dentro de una punta de pipeta, reteniéndose los analitos por aspiración repetida con pipetas mono o multicanal y la posterior desorción, y las **placas de múltiples pocillos**, generalmente empleadas con 96 o 384 pocillos, colocándose en cada uno de ellos una pequeña columna de SPE que contiene el adsorbente, pudiendo realizar varias extracciones de manera simultánea [133,134]. En los últimos años se ha desarrollado una nueva técnica de preparación de muestra, la **microextracción con adsorbentes empaquetados** (*Microextraction in Packed Sorbent*, MEPS) en la que el adsorbente no se introduce en ninguna columna ni disco, si no que se inserta directamente en la jeringa que se utiliza para la inyección de la muestra en el sistema cromatográfico [135].

1.3. Materiales adsorbentes

Para optimizar el proceso de SPE, además de seleccionar un disolvente adecuado para la elución de los analitos de la fase sólida, debemos optimizar el adsorbente empleado teniendo en cuenta factores como el pH de la muestra, la fuerza iónica o el tipo de interacciones con los componentes de la matriz de la muestra. También se necesita conocer cómo los diferentes tipos de adsorbentes afectan a la retención y a la etapa de elución de los compuestos de interés. Para cada tipo de muestra existirá un adsorbente óptimo que dará una excelente retención y elución para un analito o familia de analitos [128].

Para la clasificación de los adsorbentes, es conveniente dividirlos en tres grupos: óxidos inorgánicos, adsorbentes de baja especificidad y adsorbentes específicos de compuestos y de clases.

Los **óxidos inorgánicos** más importantes utilizados como adsorbentes para SPE son la sílice, la alúmina, el Florisil (silicato de magnesio sintético) y la tierra de diatomeas. La retención de los analitos depende del número y del tipo de grupos funcionales que presentan, de manera que actúan reteniendo fuertemente a los grupos funcionales susceptibles de formar enlaces por puente de hidrógeno, tales como ácidos carboxílicos o hidroxilos y en menor medida a los grupos que presentan un carácter dipolar significativo, como es el caso de cetonas o ésteres y grupos funcionales polarizables como anillos aromáticos y alquenos. La alúmina y la sílice pueden funcionar también como intercambiadores de iones selectivos con muestras acuosas tamponadas [136].

Los **adsorbentes de baja especificidad** son comúnmente empleados para retener contaminantes en muestras acuosas. Este tipo de adsorbentes incluye las sílices químicamente enlazadas, los polímeros porosos y el carbón grafitizado:

El **carbón negro grafitizado (Graphitized Carbon Black, GCB)** fue uno de los primeros adsorbentes empleados para aislar compuestos polares con una alta solubilidad en agua ($>1 \text{ g L}^{-1}$). Se trata de un adsorbente no poroso cuyo mecanismo de retención consiste en interacciones electrónicas π - π y, además, debido a su superficie cargada positivamente, también puede actuar como intercambiador aniónico. Este tipo de adsorbentes presenta

como desventaja la dificultad para la elución de los analitos debido a la fuerte interacción que se produce con estos [131,137].

Las **sílices enlazadas** se obtienen por reacción de organosilanos con sílice activada mediante la formación de enlaces Si-O-Si-C. La fase enlazada contiene grupos funcionales que son empleados para distintos modos de separación, tales como fase reversa, normal o intercambio aniónico.

- En Fase Normal, la adsorción del analito se produce sobre una superficie polar por enlaces tipo puente de hidrógeno, interacciones dipolo-dipolo y dipolo-dipolo inducido e interacciones π - π . Se emplea para aislar analitos más polares que la matriz en la que se encuentran, utilizándose principalmente para el proceso de purificación de extractos orgánicos.
- En Fase Reversa, el mecanismo de aislamiento de los analitos consiste mayoritariamente en interacciones no polares tipo Van der Waals, de manera que la partición de los compuestos ocurre entre una fase sólida poco polar y un disolvente polar. Se emplean para extraer compuestos que se encuentran en matrices con una mayor polaridad, como el agua o alimentos acuosos.
- En Intercambio Iónico, el mecanismo implica interacciones de tipo electrostático entre el adsorbente cargado y el analito cargado, en un disolvente polar o no, de manera opuesta. Los adsorbentes actúan como intercambiadores aniónicos o catiónicos fuertes con una carga fija permanente, positiva o negativa, respectivamente.

El uso de adsorbentes basados en sílices enlazadas presenta ventajas como la estabilidad en disolventes orgánicos y en disoluciones ácidas (con pH entre 1 - 8.5), pero su uso no es adecuado en algunos casos debido a que pueden contener grupos silanol libres que pueden interactuar de manera irreversible con determinados analitos. Hay una amplia gama de grupos funcionales que pueden ser enlazados (Tabla II.B.1), lo que hace de estos adsorbentes de SPE los más populares para la preparación de muestra [128,131].

Tabla II.B.1: Sílices enlazadas de fase normal, fase reversa e intercambio iónico comunes en SPE.

Fase enlazada	Estructura	Tipo de fase
Octadecilsilano (C ₁₈)	-Si-(CH ₂) ₁₇ -CH ₃	Reversa
Octilsilano (C ₈)	-Si-(CH ₂) ₇ -CH ₃	Reversa
Etilsilano (C ₂)	-Si-CH ₂ -CH ₃	Reversa
Fenilsilano (PH)	-Si-PH	Reversa
Ciclohexilsilano (CH)	-Si-C ₆ H ₁₁	Reversa
Cianopropilsilano (CN)	-Si-(CH ₂) ₃ -CN	Normal
Diolsilano (2OH)	-Si-(CH ₂) ₄ -CHOH-CH ₂ OH	Normal
Aminopropilsilano (NH ₂)	-Si-(CH ₂) ₃ -NH ₂	Normal
N-propiletilen-diaminosilano (PSA)	-Si-(CH ₂) ₃ -NH-(CH ₂) ₂ -NH ₂	Normal
Carboxietilsilano (CBA)	-Si-CH ₂ -COO ⁻	Intercambio catiónico
Sulfonilpropilsilano (PRS)	-Si-(CH ₂) ₃ -SO ₃ ⁻	Intercambio catiónico
Bencenosulfonil-propilsilano (SCX)	-Si-(CH ₂) ₃ -Ph-SO ₃ ⁻	Intercambio catiónico
Trimetilaminopropilsilano (SAX)	-Si-(CH ₂) ₃ -N ⁺ -(CH ₃) ₃	Intercambio aniónico
Dietilaminopropilsilano (DBA)	-Si-(CH ₂) ₃ -NH ⁺ -(CH ₂ -CH ₂) ₂	Intercambio aniónico

Los **adsorbentes poliméricos** son una alternativa a las sílices enlazadas, presentando como ventajas una alta estabilidad en todo el rango de pH desde 0 a 14, la ausencia de grupos silanol libres y una mayor capacidad por gramo de adsorbente en comparación con los materiales con base de sílice. Los adsorbentes poliméricos más comunes son los formados por copolímeros de poli(estireno-divinilbenceno) (PS-DVB), con una superficie específica hidrofóbica de hasta 800 m² g⁻¹, por lo que la mayoría de sus aplicaciones se dan en SPE en fase reversa. Las interacciones del adsorbente con los analitos son de tipo π-π con los anillos aromáticos de su estructura polimérica, y a través de fuerzas de Van der Waals [138].

Debido a la limitada capacidad de los adsorbentes de PS-DVB para compuestos más polares, se han desarrollado nuevos materiales con base polimérica con una mayor área superficial, copolimerizando monómeros hidrofílicos o modificando químicamente polímeros de base PS-DVB con un grupo funcional polar, incrementando de ese modo el número de puntos de interacción entre el adsorbente y el analito. Los primeros adsorbentes que se utilizaron con estas características fueron los basados en metacrilato-divinilbenceno (MA-DVB), comercializados en la actualidad como Amberlita XAD-7 y Amberlita XAD-8 por *Applied Separations*. Posteriormente, la casa comercial *Waters Corporation* desarrolló un copolímero macroporoso basado en poli(N-vinilpirrolidona-divinilenceno) (PVP-DVB), más conocido como Balance Hidrofílico Lipofílico (*Hydrophilic Lipophilic Balance*, OASIS[®] HLB). Se

trata del adsorbente polimérico más utilizado debido a sus aplicaciones para la extracción de compuestos con un amplio intervalo de propiedades físico-químicas de diferentes matrices [138].

En la actualidad existen alternativas al uso del adsorbente OASIS® HLB, aunque ninguno ha tenido tanto impacto como éste, como son los Porapak RDX, comercializados también por la compañía *Waters Corporation* con la misma composición de PVP-DVB pero con una menor superficie ($500 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$), lo que reduce la retención de los analitos en el adsorbente. También, se utiliza el adsorbente Absolut Nexus desarrollado por *Varian*, basado en el copolímero MA-DVB, para el que se han alcanzado resultados similares y en algunos casos mejores a los obtenidos con los OASIS® HLB [139]. Otro tipo de adsorbentes hidrofílicos son los polímeros modificados con algún grupo funcional polar, como en el caso de los Strata X comercializados por *Phenomenex*, que consisten en un copolímero PS-DVB modificado con grupos pirrolidona o Strata XL, con la misma composición, pero un mayor tamaño de poro (300 \AA frente a los 85 \AA de Strata X), por lo que se recomienda su uso para la limpieza de matrices más complejas como las alimentarias o biológicas [138].

En los últimos años se han desarrollado nuevos **adsorbentes específicos para compuestos o clases de compuestos**, cuyo fin ha sido mejorar la selectividad durante el proceso de extracción. A este grupo pertenecen los adsorbentes de modo mixto, los materiales de acceso restringido (*Restricted-Access Material, RAM*), los adsorbentes de afinidad y los polímeros impresos molecularmente (*Molecularly Imprinted Polymer, MIP*).

Los adsorbentes de **modo mixto** combinan un esqueleto polimérico con grupos iónicos, de manera que los tipos de interacción que se dan son de fase reversa y de intercambio iónico. Estos adsorbentes de modo mixto están basados en el adsorbente HLB, modificado químicamente con grupos cambiadores catiónicos fuertes como los sulfónicos, y débiles como los carboxílicos, dando lugar a los materiales OASIS® MCX (*Mixed-Mode Cation Exchange*) y OASIS® WCX (*Mixed-Mode Weak Cation Exchange*) respectivamente, o modificados con grupos cambiadores aniónicos fuertes como las aminas cuaternarias en los materiales OASIS® MAX (*Mixed-Mode Anion Exchange*) y débiles como la piperazina para los OASIS® WAX (*Mixed-Mode Weak Anion Exchange*) [138].

En el mecanismo de adsorción de los analitos en los **materiales de acceso restringido**, además de tener en cuenta la afinidad de los analitos por el adsorbente, se tiene en cuenta también el tamaño de las moléculas, de manera que sólo aquellas de un tamaño determinado quedarán retenidas, al ser las únicas capaces de penetrar en los poros en cuya superficie interna se encuentra el adsorbente, mientras que las de mayor tamaño serán eluidas durante el paso de la muestra. Entre los RAM más utilizados destacan los llamados adsorbentes de superficie semipermeable (*Semipermeable Surface*, SPS), los adsorbentes hidrofóbicos de embalaje blindado (*Shielded Hydrophobic Packings*, SHP) y los adsorbentes de fase de doble zona (*Dual-Zone Phase*, DZP) [131].

Los **adsorbentes de afinidad** nacen de la búsqueda de materiales más selectivos que minimicen el problema de la co-extracción de interferencias matriciales. Están constituidos por un soporte inerte sobre el que se inmovilizan enzimas, anticuerpos u hormonas, capaces de reconocer e interactuar con su correspondiente sustrato. Los más conocidos son los inmunoabsorbentes, que se basan en interacciones antígeno-anticuerpo en las que se pueden ver involucradas fuerzas del tipo puente de hidrógeno, enlaces iónicos, fuerzas hidrofóbicas o fuerzas de Van der Waals. Las principales desventajas de estos adsorbentes son su baja estabilidad, la dificultad y el elevado coste de su síntesis, por lo que existen muy pocos comercialmente, lo que limita sus aplicaciones [128,131].

Los **polímeros impresos molecularmente** actúan de manera similar a los adsorbentes de afinidad presentando una alta selectividad, con las ventajas de un menor coste, mayor facilidad y reproducibilidad de síntesis. Se preparan combinando una molécula plantilla con un monómero y un agente entrecruzante, dando lugar a un polímero rígido alrededor de esta plantilla. Una vez se elimina el compuesto plantilla, el polímero presenta cavidades o huellas diseñadas para retener el analito selectivamente [128].

1.4. Aplicaciones de SPE a la determinación de pesticidas, estilbenos y OTA en vino

En la Tabla II.B.2 se muestran las aplicaciones de SPE a la determinación de pesticidas en muestras de vino. La fase reversa es el modo de trabajo preferido para este tipo de compuestos en esta matriz y los adsorbentes OASIS® los empleados con mayor frecuencia, destacando el amplio uso del adsorbente HLB. En ocasiones, los extractos que se obtienen contienen demasiadas interferencias por lo que requieren una etapa de limpieza adicional antes del análisis, que pueden consistir en el uso de adsorbentes como carbón grafitizado (GCB), *N*-propiletilen-diaminosilano (PSA) o la combinación de ambos [140]. También se han descrito aplicaciones en las que se utilizan para eliminar interferencias otros materiales como MgSO₄ [141] y adsorbentes de fase normal [142].

Para la determinación de micotoxinas, una de las técnicas más empleadas consiste en la extracción mediante columnas de inmunoafinidad (*Immunoaffinity Columns*, IAC), de manera que los analitos se unen específicamente a los anticuerpos monoclonales presentes en la columna, mientras que el resto de los compuestos no pueden hacerlo. Posteriormente, las toxinas se eluyen mediante la desnaturalización de los anticuerpos. Debido al elevado precio de estas columnas, también se emplean otro tipo de adsorbentes tal como se indica en la Tabla II.B.3, basados en el uso de MIPs y materiales como OASIS® HLB o carbón grafitizado, obteniendo resultados similares a los alcanzados con el uso de IAC [93,143].

En el caso de la extracción de estilbenos en muestras de vino, una de las técnicas más extendidas es SPE en fase reversa, utilizando los materiales OASIS® o las sílices enlazadas, como se indica en las aplicaciones recogidas en la Tabla II.B.4. Debido a la presencia de grupos fenólicos en la estructura de estos compuestos, cuando su análisis se realiza utilizando cromatografía de gases (GC), es necesario añadir una etapa de derivatización de los compuestos antes de la extracción de los analitos de la muestra o en el extracto final, después de la etapa de SPE y antes de su determinación [123].

Tabla II.B.2: Aplicaciones de SPE a la determinación de pesticidas en vino.

Analitos	Muestras	Extracción	Detección	R (%)	Ref.
TRI, TR, FLU, DI	50 mL vino (tinto, rosado y blanco) diluido 1:1 con agua ultrapura	OASIS® HLB 200 mg Acond: 6 mL MeOH, 6 mL agua ultrapura Elución: 3 mL MeOH	LC-MS	95 - 102	[144]
AZO, MET, DIF, PEN, DIN, PR, FLU, TEB, MYC	10 mL vino (tinto y blanco) diluido 1:1 con agua ultrapura	OASIS® MAX 150 mg Acond: 5 mL MeOH, 5 mL agua ultrapura (pH 6), 5 mL agua ultrapura (pH 4) Lavado: 5 mL NH ₄ OH (5 % m/v) Elución: 1 mL MeOH	LC-MS/MS	72 - 96	[63]
MET, BEN, PEN, DI, PRO, DIF, TEB, FLUS, TR, MYC, AZO, CYP, IP	10 o 20 mL vino (tinto y blanco) diluido 1:2 con agua ultrapura	OASIS® HLB 200 mg Acond: 5 mL ACN, 5 mL agua ultrapura (pH 3.6) Lavado: 10 mL agua ultrapura Elución: 2 mL ACN	LC-MS/MS	84 - 114	[66]
ACE, IMI, THC, PRC, FEN, PYR, MET, CYP, TR, MYC, AZO, TRI, FLU, PEN, PR	10 mL vino (tinto y blanco) diluido 1:9 con agua ultrapura	OASIS® HLB 200 mg Acond: 6 mL MeOH, 6 mL agua ultrapura Lavado: 5 mL agua ultrapura Elución: 2 x 5 mL MeOH, 0.5 mL agua ultrapura Concentración a 0.5 mL	LC-MS/MS	70 - 110	[145]
AZO, BEN, DIF, DI, FEN, FLU, IPR, MET, MYC, PEN, PR, PY, PYR, EB, TR, TRI, ACE, IMI, THC, THM, IMI	4 mL vino tinto	OASIS® HLB 200 mg Acond: 4 mL MeOH, 4 mL agua ultrapura Lavado: 4 mL MeOH:agua ultrapura (5:95, v/v) Elución: 2 x 4 mL MeOH Concentración a sequedad y reconstitución con MeOH:agua ultrapura (20:80, v/v)	LC-MS	78 - 101	[146]
PEN, PY	10 mL vino (tinto, rosado y blanco)	C ₁₈ 500mg (Bond Elut® LRC-C ₁₈ INT) Acond: 5 mL MeOH, 3 mL agua ultrapura Lavado: 10 mL MeOH:agua ultrapura (10:90, v/v) Elución: 5 mL diclorometano Concentración a sequedad y reconstitución con 10 mL AcOEt.	GC-MS	91 - 106	[147]
AZO, BEN, FLUD, IPR, MET, MYC, PR, PY, PYR, TEB, THM	10 mL vino tinto diluido 1:1 con agua ultrapura	OASIS® HLB 60 mg Acond: 3 mL ACN, 3 mL agua ultrapura Lavado: 3 mL MeOH:agua ultrapura (50:50, v/v) Elución: 1 x 2 mL n-hexano, 2 x 4 mL ACN	GC-MS	75 - 114 *50 % THM	[65]

Tabla II.B.3: Aplicaciones de SPE a la determinación de OTA en vino.

Muestras	Extracción	Detección	R (%)	Ref.
4 mL vino tinto	-OASIS® HLB 200 mg -Acond: 4 mL MeOH, 4 mL agua ultrapura -Lavado: 4 mL MeOH:agua ultrapura (5:95, v/v) -Elución: 2 x 4 mL MeOH -Concentración a sequedad y reconstitución MeOH:agua ultrapura (20:80, v/v)	LC-MS	117	[146]
4 mL vino (tinto y blanco)	-OASIS® HLB 200 mg -Acond: 5 mL ACN, 5 mL NH ₄ Ac 10 mM -Lavado: 5 mL NH ₄ Ac 10 mM -Elución: 5 mL NH ₄ Ac (10 mM):ACN (50:50, v/v), 5 mL ACN -Concentración a sequedad y reconstitución con 1 mL agua ultrapura	UPLC-MS/MS	105	[148]
10 mL vino tinto diluido 1:1 con una disolución 1% PEG y 5% NaHCO ₃	-Columna de inmunoafinidad OchraTest -Lavado: 5 mL NaCl (2.5 %, m/v) y NaHCO ₃ (0.5 %, m/v), 5 mL agua ultrapura -Elución con 2 mL MeOH -Pasar extracto en MeOH por columna Bondesil-NH ₂ , 50 mg (Acond: 6 mL AcOEt:ciclohexano (3:7) con 2 % HCOOH, 2 mL MeOH) -Lavado: 2.5 mL AcOEt, 2 mL AcOEt:ciclohexano (3:7) con 0.1 % ác. fórmico, 0.5 mL AcOEt:ciclohexano (3:7) con 0.75 % ác. fórmico -Elución: 2 mL AcOEt:ciclohexano (3:7) con 0.75 % ác. fórmico	LC-FLD	95 - 105	[149]
10 mL vino tinto diluido 1:1 con una disolución 1% PEG 6000 y 5% NaHCO ₃	-Columna de inmunoafinidad OCHRAPREP® -Lavado: 5 mL NaCl (2.5%, m/v) y NaHCO ₃ (0.5 %, m/v), 5 mL agua ultrapura -Elución 2 mL MeOH:AcOH (98:2) -Concentración a sequedad y reconstitución con 500 µL ACN/agua ultrapura:AcOH (99:99:2)	LC-FLD	93 - 95	[150]
2 mL vino tinto diluido 1:2 con una disolución 1% de PEG 8000	-MIP preparado con una plantilla de N-(4-cloro-1-hidroxi-2-naphthoylamido)-L-fenilalanina, 250mg -Acond: 5 mL tampón citrato-tartrato pH 3.2 (ác. cítrico 30 mM + ác. tartárico 0.5mM + KCl 8mM) -Lavado: 1 mL agua ultrapura:acetona (80:20, v/v), 1 mL agua ultrapura:ACN (80:20, v/v), 1 mL agua ultrapura:tetrahidrofurano (80:20, v/v) -Elución: 2 mL ACN:AcOH (98:2, v/v) -Lavado MIP con 5 mL MeOH:AcOH (90:10, v/v)	LC-FLD	92 - 110	[151]
10 mL vino tinto diluido 1:1 con agua ultrapura (ajustado a pH 1.0)	-Columna SPE-MIP AFFINIMIP® -Acond: 5 mL ACN, 5 mL agua ultrapura -Lavado: 7 mL HCl 0.1M:ACN (60:40, v/v) -Elución: 2 mL MeOH con 2 % AcOH -Concentración a sequedad y reconstitución con 1 mL MeOH:agua ultrapura 0.5 % AcOH (65:35, v/v) -Lavado MIP con 10 mL MeOH	LC-MS/MS	92 - 103	[93]

Tabla II.B.4: Aplicaciones de SPE a la determinación de estilbenos en vino.

Analitos	Muestras	Extracción	Detección	R (%)	Ref.
t-RESV	10 mL vino (tinto y blanco) diluido 1:1 con agua ultrapura	-OASIS® MAX 60 mg -Lavado 10 mL agua ultrapura -Elución 2 mL MeOH -Derivatización con 10 mL K ₂ HPO ₄ , 50 µL anhídrido acético. -Extracción 2 mL isoctano	GC-MS	92 - 108	[123]
t-RESV	900 µL vino (tinto y blanco), pH 2.7	-OASIS® HLB 30 mg -Acond: 1 mL AcOEt, 1 mL MeOH, 1 mL agua ultrapura -Lavado: MeOH 5 % -Elución: 500 µL MeOH, 1 mL AcOEt, 500 µL MeOH -Concentración a sequedad y reconstitución con 1mL MeOH:agua ultrapura (80:20, v/v) con 0.1 % ácido fórmico	UPLC-PDA	93 - 105	[152]
t-RESV	1 mL vino tinto	-Sep-Pak Plus C18 + Sep-Pak Plus PS-1 (360 mg cada uno) -Acond: 5 mL MeOH, 5 mL NH ₄ Ac 20 mM, pH 5.5 -Lavado: 2.5 mL MeOH:NH ₄ Ac 20 mM (10:90, v/v) -Elución: 1 mL MeOH:NH ₄ Ac 20 mM (85:15, v/v)	LC/MS	75 - 90	[153]
c-RESV, t-RESV, t-PICE, t-PICEA	1 mL vino (tinto y blanco)	-Sep-Pak C18 -Acond: 3 mL MeOH, 6 mL ác. fórmico 1.8 mM -Lavado: 3 mL agua ultrapura -Elución: 2 mL MeOH -Concentración a sequedad y reconstitución con 100 µL MeOH	LC-MS/MS	-	[126]

2. MICROEXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA

La microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME) es una técnica desarrollada por Assadi y col. [154] como búsqueda de nuevos métodos de preparación de muestra rápidos y económicos para la extracción de compuestos orgánicos en muestras acuosas, reduciendo el consumo de disolventes que se utilizan en la extracción líquido-líquido (LLE) y de esa manera minimizar los efectos que producen en el medio ambiente. Se trata de una modalidad de microextracción en fase líquida (*Liquid-Phase Microextraction*, LPME) simple, con una cinética muy rápida que permite llevar a cabo de manera simultánea, la extracción y concentración de los analitos. Debido a las ventajas que ofrece esta técnica, su uso se ha extendido rápidamente con aplicaciones en el análisis de alimentos y medioambiental.

Esta técnica se fundamenta en el uso de un sistema ternario de disolventes formado por una **fase acuosa**, que normalmente corresponde con la muestra, en donde se encuentran inicialmente los analitos que queremos extraer, y dos disolventes orgánicos. Uno de esos disolventes es el **agente extractante**, inmisible con la fase acuosa, con el que queremos extraer los analitos y el **agente dispersante**, que debe ser miscible tanto con la fase acuosa como con el agente extractante.

2.1. Etapas del proceso

En el proceso de DLLME, un pequeño volumen de la mezcla formada por los disolventes orgánicos (agentes extractante y dispersante), se inyecta rápidamente, con ayuda de una jeringa, en la muestra acuosa en donde se encuentran los analitos. Esto hace que se forme una emulsión con diminutas gotas del disolvente de extracción, lo que incrementa la superficie de contacto entre la muestra y la fase extractante, produciendo como resultado la transferencia de los analitos desde la muestra de manera rápida y eficaz. Después de un tiempo de agitación y centrifugación, ambas fases se separan, recogiendo la orgánica con una jeringa para su posterior análisis mientras que en la fase acuosa queda disuelto la mayor parte del agente dispersante.

A continuación, se muestra en la Figura II.B.2 un esquema en el que se indican las etapas del proceso de DLLME.

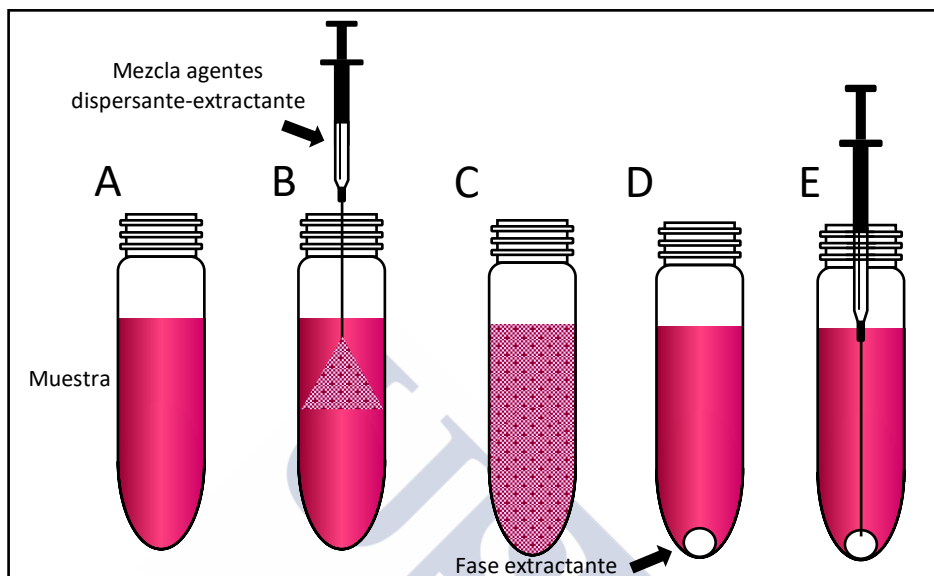


Figura II.B.2: Esquema del proceso de DLLME. (A) Muestra problema. (B) Inyección de la mezcla de los agentes dispersante y extractante. (C) Formación de la emulsión y posterior centrifugación. (D) Separación de la fase extractante. (E) Recogida del extracto.

2.2. Modalidades de trabajo en DLLME

En su primera aplicación, en DLLME se utiliza como agente extractante un disolvente de alta densidad e inmiscible con el agua [154]. La fase acuosa se deposita en un tubo cónico y después de la inyección del agente dispersante conteniendo al extractante se forma una emulsión. Tras su centrifugación, la fase sedimentada en el tubo se puede recoger e inyectar directamente en el equipo de cromatografía para llevar a cabo la cuantificación de los analitos.

Sin embargo, debido a la toxicidad de los agentes extractantes de alta densidad habitualmente utilizados (clorobenceno, cloroformo, tetracloruro de carbono, disulfuro de carbono y tricloroetano), se ha desarrollado una modalidad de DLLME denominada microextracción líquido-líquido dispersiva con solidificación de gota flotante (*DLLME based on the Solidification of a Floating Organic drop*, DLLME-SFO) en la que se emplean disolventes

con una densidad más baja que la fase acuosa y un punto de fusión comprendido entre 0 °C y temperatura ambiente para extraer los analitos. Después de la centrifugación, el extractante se concentra en la parte superior del tubo sobre la muestra acuosa. Para permitir la manipulación de volúmenes de extractante muy bajos, el tubo se introduce en un baño de hielo, de manera que la fase extractante se solidifica, retirándola a un vial donde volverá a estado líquido a temperatura ambiente [155].

A lo largo de los años se han ido introduciendo modificaciones en DLLME con el fin de obtener mayores eficacias de extracción acortando el número de etapas de la técnica. Entre ellos, Regueiro y col. [156] desarrollaron una variante de DLLME, la microextracción-emulsificación asistida por ultrasonidos, (*Ultrasound-Assisted Emulsification-Microextraction*, USAEME) y Yiantzi y col. [157] la microextracción líquido-líquido asistida por agitación vórtex (*Vortex-Assisted Liquid-Liquid Microextraction*, VALLME) en las que se prescinde del agente dispersante, inyectando únicamente en la muestra el agente extractante y empleando ultrasonidos o agitación vórtex respectivamente, para favorecer la formación de la emulsión.

Se han diseñado también modalidades de DLLME en las que se intenta acelerar el proceso de formación de la fase extractante, utilizando agentes surfactantes, dando lugar a la microextracción asistida por ultrasonidos con emulsificación mejorada con surfactante, (*Ultrasound-Assisted Surfactant-Enhanced Emulsification Microextraction*, UASEME) desarrollada por Wu y col. [158]. Otra de las modificaciones más importantes ha sido introducida por Zacharis y col. [159], la microextracción líquido-líquido dispersiva acoplada a demulsificación con disolventes (*Solvent-based de-emulsification Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*, SD-DLLME) en la que se adiciona un disolvente para romper la emulsión en lugar de centrifugar la muestra.

A continuación, en la Tabla II.B.5, se muestran las principales variantes de DLLME y la primera de las aplicaciones correspondiente a cada modalidad.

Tabla II.B.5: Modalidades de DLLME descritas en la bibliografía.

Método	Abreviatura	Aplicaciones	Ref.
Microextracción líquido-líquido dispersiva con solidificación de gota flotante (<i>DLLME based on the solidification of a floating organic drop</i>)	DLLME-SFO	Pesticidas Organoclorados	[155]
Microextracción-emulsificación asistida por ultrasonidos (<i>Ultrasound-assisted emulsification-microextraction</i>)	USAEME	Fragancias, Ftalatos y Lindano	[156]
Microextracción líquido-líquido asistida por agitación vórtex (<i>Vortex-assisted liquid-liquid microextraction</i>)	VALLME	Alquilfenoles	[157]
Microextracción asistida por ultrasonidos con emulsificación mejorada con surfactante (<i>Ultrasound-assisted surfactant-enhanced emulsification microextraction</i>)	UASEME	Carbamatos	[158]
Microextracción líquido-líquido dispersiva acoplada a demulsificación con disolventes (<i>Solvent-based de-emulsification dispersive liquid-liquid microextraction</i>)	SD-DLLME	Pesticidas Organoclorados	[159]
Microextracción líquido-líquido dispersiva con líquidos iónicos (<i>Ionic liquid based dispersive liquid-liquid microextraction</i>)	IL-DLLME	Aminas aromáticas	[160]
Microextracción líquido-líquido asistida por aire (<i>Air-assisted liquid-liquid microextraction</i>)	AALLME	Ftalatos	[161]
Microextracción dispersiva líquido-líquido con poco consumo de disolvente (<i>Dispersive liquid-liquid microextraction with little solvent consumption</i>)	DLLME-LSC	Pesticidas Organoclorados	[162]

2.3. Fundamento teórico

La eficacia de extracción en DLLME se evalúa en función de dos parámetros, el **factor de enriquecimiento** (EF), definido como el cociente entre la concentración del analito en la fase extractante (C_e) y la concentración inicial de analito en la muestra (C_0) (Ecuación 1) y la **eficacia de extracción** (EE), que se define como el cociente entre el número de moles del analito que pasa de la fase extractante (n_e) y el total inicial en la muestra (n_0) multiplicado por 100. Se calcula multiplicando el EF por el cociente entre el volumen de la fase extractante (v_e) y el de la muestra (v_{aq}) (Ecuaciones 2 y 3) [154].

$$EF = \frac{C_e}{C_0} \quad \text{Ecuación 1}$$

$$EE = \frac{n_e}{n_0} 100 = \frac{C_e V_e}{C_0 V_{aq}} 100 \quad \text{Ecuación 2}$$

$$EE = \left(\frac{V_e}{V_{aq}} \right) EF 100 \quad \text{Ecuación 3}$$

La EE está directamente influenciada por el tipo de agente dispersante y extractante utilizados, así como por sus volúmenes. Otros factores que deben evaluarse para la optimización del proceso DLLME son los tiempos de extracción y centrifugación, así como la fuerza iónica y el pH de la muestra.

2.4. Factores que afectan a la eficacia de extracción

Como se ha indicado anteriormente, existen diferentes factores que afectan a la extracción que deben ser optimizados para obtener una buena eficacia del proceso. Estos factores son: la selección de los agentes dispersante y extractante adecuados, el volumen de estos agentes, el tiempo de extracción y centrifugación, la fuerza iónica y el pH de la muestra y la adición de agentes derivatizantes.

2.4.1. Selección del agente extractante

El disolvente de extracción seleccionado debe cumplir varios requisitos como presentar una baja toxicidad y baja solubilidad en agua para que las fases acuosa y extractante se separen después de la etapa de centrifugación. Además, debe ser capaz de extraer bien los analitos deseados y presentar un buen comportamiento cromatográfico con un tiempo de retención distinto al de los analitos. Los disolventes más utilizados en DLLME son los hidrocarburos halogenados como tetracloruro de carbono (CCl_4), clorobenceno (ClBz), tricloroetano (CH_2Cl_2) y cloroformo ($CHCl_3$) [163], líquidos iónicos [160] y disulfuro de carbono (CS_2) [164]. En el caso de DLLME-SFO, el disolvente debe tener una densidad inferior a 1 g mL^{-1} y un punto de fusión próximo a la temperatura ambiente, como 1-

undecanol (1-UND), 1-dodecanol (1-DOD), 2-dodecanol, (2-DOD) o hexadecano (HEX) [155]. A continuación, se muestra una tabla con las propiedades de estos disolventes.

Tabla II.B.6: Propiedades de los agentes extractantes más utilizados en DLLME.

Disolvente	Densidad (g mL ⁻¹)	Punto de fusión (°C)	Solubilidad en agua (g L ⁻¹)	log K _{ow}
CCl ₄	1.59	-23	0.29	2.92
CIBZ	1.11	-45.2	0.086	2.84
CH ₃ CCl ₃	1.74	-30.4	0.68	2.35
CHCl ₃	1.48	-63.2	1.6	1.94
CS ₂	1.26	-111.5	0.38	1.94
1-UND	0.83	19	0.034	4.41
1-DOD	0.83	24	9.3 x 10 ⁻³	4.91
2-DOD	0.83	19	0.013	4.76
HEX	0.77	18	1.7 x 10 ⁻⁵	8.86

2.4.2. Selección del agente dispersante

De cara a la elección del agente dispersante, se necesitan disolventes miscibles tanto con el agente extractante, ya que la mezcla de esos disolventes se inyecta en la muestra, como con la fase acuosa. De esa manera, se produce la formación de la emulsión que da lugar a la transferencia de los analitos desde la muestra a la fase extractante. Los disolventes que se emplean con más frecuencia son acetona, metanol, acetonitrilo y tetrahidrofurano [165].

2.4.3. Selección del volumen de extractante

La eficacia de extracción (EE) de DLLME está directamente influenciada por el volumen de agente extractante utilizado, de manera que un aumento de este dará lugar a mayores valores de EE, pero, a su vez, la concentración del analito en la fase extractante (C_e) será menor, obteniéndose valores de EF más bajos. El volumen óptimo será aquel que proporcione un compromiso entre el EF y la EE y, además, deberá ser fácilmente manipulable, por lo que normalmente se utilizan valores comprendidos entre 15 y 200 µL.

2.4.4. Selección del volumen de dispersante

El volumen de dispersante influye directamente en la formación de la emulsión, facilitando así el paso de los analitos de la muestra a la fase extractante por lo que, al aumentar este volumen, aumentará el número de gotas en esa emulsión produciendo un mejor contacto entre fases. Por otro lado, el uso de un gran volumen de dispersante puede afectar a la formación de la fase extractante además de incrementar la solubilidad de los analitos en la muestra acuosa, por lo que ambos factores deben de tenerse en cuenta. El volumen óptimo empleado suele estar comprendido entre 0.5 y 2 mL para volúmenes de muestra de 10 mL.

2.4.5. Tiempos de extracción y centrifugación

En DLLME, el tiempo de extracción se define como el intervalo comprendido entre la inyección de la mezcla formada por los agentes extractante y dispersante en la muestra hasta el comienzo de la centrifugación. Durante este periodo, los tubos se agitan para mantener la emulsión, aunque este parámetro no tiene apenas influencia sobre la eficacia de extracción (EE) ya que el equilibrio entre las fases acuosa y extractante, y la transferencia de masa entre ambas ocurre de manera inmediata tras la dispersión.

Para que se produzca la separación de las fases es necesario centrifugar la mezcla formada por los agentes dispersante y extractante con la muestra acuosa. Se trata de un proceso rápido, por lo que el tiempo de centrifugación en la mayoría de las aplicaciones de DLLME suele ser de 1 a 5 min.

2.4.6. Fuerza iónica y pH de la muestra

La adición de sal a la muestra puede presentar varios efectos sobre la eficacia de extracción. Por un lado, la adición de sal aumenta ligeramente el volumen de extractante que contiene a los analitos después de la separación de fases, probablemente debido a la disminución de la solubilidad del disolvente de extracción en presencia de sal, dando lugar a una disminución del factor de enriquecimiento (EF) y a extractos más diluidos. Por otro lado,

incrementa la eficacia de extracción (EE) ya que disminuye la solubilidad de los analitos en la muestra, favoreciendo su paso a la fase extractante, por lo que se trata de un factor importante que requiere especial atención durante la optimización de la extracción.

En cuanto al pH de la muestra, sólo las formas neutras de los analitos son extraídas en DLLME por lo que, a veces se debe variar el pH de la muestra en la que estén presentes especies ácidas o básicas para obtener la forma neutra.

2.4.7. Agentes derivatizantes

Puesto que DLLME se usa fundamentalmente en combinación con cromatografía de gases como técnica de determinación, en ocasiones es necesario la adición de agentes derivatizantes durante el proceso de DLLME de compuestos polares y no volátiles para aumentar su volatilidad y poder llevar a cabo su determinación. Esta adición puede realizarse sobre la muestra antes de la inyección de la mezcla del agente dispersante conteniendo al extractante [166], o en la fase extractante antes de su inyección en el sistema cromatográfico [167]. Además de esto, Huang y col. [168] desarrollaron un método para realizar la extracción y derivatización en un solo paso, para la determinación de anilinas en aguas residuales, empleando acetona como agente dispersante, clorobenceno como disolvente extractante y pentafluorobenzaldehído como reactivo derivatizante. Otras combinaciones de DLLME con derivatización simultánea han sido descritas para benzotriazoles [169] y triclosán [170].

2.5. Aplicaciones de DLLME a la determinación de pesticidas y estilbenos en vino

DLLME supone una buena alternativa a LLE para el análisis de distintos tipos de compuestos orgánicos en muestras acuosas debido a su simplicidad operacional, por lo que se ha convertido en una herramienta útil en los últimos años. Son numerosas las aplicaciones que se han publicado aunque se ha descrito que esta técnica se utiliza principalmente para el análisis de pesticidas en muestras acuosas [171]. Además, su combinación con GC utilizando disolventes adecuados, hace que sea el procedimiento más favorable para la determinación de estos compuestos. Para el acoplamiento con LC, en la mayoría de los casos

es necesario concentrar a sequedad la fase extractante y redisolver el extracto en un disolvente compatible con las separaciones en fase reversa.

En el caso de los estilbenos, las únicas aplicaciones de DLLME para la extracción de estos compuestos se han descrito en esta Tesis, utilizando GC como técnica de determinación. Para ello, es necesaria una etapa de derivatización, frecuentemente sililación o acilación, debido a los grupos hidroxilo presentes en la estructura de estos compuestos haciendo que sea posible su determinación por esta técnica.

En la Tabla II.B.7 se muestran algunas aplicaciones directas de DLLME para la extracción de los pesticidas estudiados. Además, también se indica el procedimiento del trabajo desarrollado en esta Tesis para la extracción de estilbenos en vino [172].

Tabla II.B.7: Aplicaciones de DLLME a la determinación de pesticidas y estilbenos en vino.

Analitos	Muestras	Extracción	Detección	EE (%)	R (%)	Ref.
MET, TRI, PRY, MYC, FLU, PR, TEB, DIF	2 mL vino (tinto y blanco) diluido con 3 mL agua ultrapura	-Agente extractante: 60 μ L cloroformo -Agente dispersante: 940 μ L ACN -Centrifugación durante 5 min, 3000 rpm -Adición de 1 g NaCl	GC-MS	-	76 - 124	[173]
BEN, CYP, IPR, MET, MYC, PRY	10 mL vino blanco	-Agente extractante: 200 μ L cloroformo -Ultrasonidos 5 min, 110 W y centrifugación 10 min, 2220 rpm -Agente extractante: 30 μ L 1-dodecanol	GC-MS	-	70 - 115	[67]
PYR, FLUD, PRY, CYP, PY	8 mL vino tinto	-Agente surfactante: 24 μ L Tween 80, 10 mM ⁻¹ -Ultrasonidos 1 min, 100 W y centrifugación 3 min, 3800 rpm -Dilución 1:1 con MeOH	LC-DAD	-	86 - 107	[174]
t-RESV, t-PICEA, t-PTERO	1 mL vino (tinto y blanco) diluido con 8 mL K ₂ HPO ₄ (5 %, m/v)	-Derivatización: 20 μ L anhídrido acético -Agente extractante: 0.1 mL CCl ₄ -Agente dispersante: 0.5 mL acetona -Centrifugación durante 5 min 3500 rpm	GC-MS	93-98	78 - 117	[172]

2.6. Pretratamiento de la muestra en DLLME: combinación SPE-DLLME

En general, DLLME es una técnica que se emplea preferiblemente para el análisis de matrices simples como agua de río o grifo [175], ya que presenta una baja selectividad y eficacia para la limpieza de las muestras. Además, en los últimos años, se han desarrollado aplicaciones de DLLME a matrices más complejas como vino, miel, aguas residuales y muestras farmacéuticas y biológicas [176,177]. Debido a la dificultad que presentan en ocasiones estas matrices, la dilución de la muestra antes de la extracción de los analitos es el método más común utilizado para disminuir los efectos de matriz que pueden afectar a la eficacia de extracción y, además, evitar problemas para separar la fase extractante. También se han aplicado otras técnicas de pretratamiento como el uso de ultrasonidos, centrifugación o filtración de la muestra, y la combinación con otras técnicas como es el caso de SPE para obtener una mayor selectividad durante la preparación de la muestra, mayores factores de concentración y mejorar la separación entre fase acuosa y extractante [178].

En esta Tesis se ha desarrollado un método multianalito que incluye el análisis de pesticidas, estilbenos, alquilfenoles, vinil y etilfenoles presentes en vino, combinando SPE con DLLME. A continuación, se muestran otras aplicaciones de la combinación de estas técnicas a muestras de vino, agua y zumo.

Tabla II.B.8: Aplicaciones de la combinación de SPE y DLLME a la determinación de pesticidas.

Analitos	Muestra	Extracción	Detección	R. absoluta (%)	Ref.
FUNGICIDAS	20 mL vino	-SPE con OASIS® HLB 60 mg y elución con 1 mL acetona -DLLME con el extracto de SPE, 10 mL agua y 0.1 mL CH ₃ CCl ₃	GC-ECD GC-MS	78 - 107	[170]
ETILFENOLES	5 mL vino diluido 1:1 con agua ultrapura	-SPE con OASIS® MAX 60 mg y elución con 1 mL acetona. -DLLME con el extracto de SPE, derivatización con 8 mL K ₂ HPO ₄ 5 %, m/v y 0.05 mL anhídrido acético y extracción con 1.5 mL acetona y 0.06 mL 1,1,1-tricloroetano	GC-MS	89 - 108	[166]
CLOROFENOLES	100 mL agua de río, pozo y grifo	-SPE con Bond Elute PPL (estireno-divinilbenceno) y elución con 1 mL acetona -DLLME con el extracto de SPE, derivatización con 5 mL K ₂ CO ₃ 0.5 %, m/v, 0.05 mL anhídrido acético y extracción con 0.03 mL clorobenceno.	GC-ECD	71 - 120	[179]
HERBICIDAS	12 mL agua de grifo y zumo	-SPE con MIP-atrazina y elución con 0.75 mL de MeOH. -DLLME con el extracto de SPE y extracción con 5 mL agua ultrapura y 0.04 mL CCl ₄	GC-FID	80 - 98	[180]
PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS	100 mL agua de río	-SPE con C ₁₈ y elución con 1 mL MeOH. -DLLME con el extracto de SPE, 5 mL NaCl 6 %, m/v y 0.06 mL dicloroetano.	LC-DAD	86 - 109	[181]

3. MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA. USO DE ADSORBENTES DE BAJO COSTE

Las técnicas de microextracción se desarrollaron como alternativa a SPE y LLE para abordar la necesidad de una rápida preparación de muestra con la posibilidad de automatizarla. Además, permiten reducir el volumen de disolventes empleados, reduciendo así el coste de la extracción.

La primera técnica de microextracción comercializada fue la microextracción en fase sólida (*Solid-Phase Microextraction*, SPME), desarrollada por Pawliszyn y col. [182]. La extracción de los analitos se realiza con una pequeña cantidad de adsorbente/absorbente de naturaleza polimérica, dispersa sobre un soporte sólido que se expone al espacio de cabeza (*Headspace-Solid Phase Microextraction*, HS-SPME) en el caso de analitos volátiles, o mediante inmersión en la muestra (*Direct Immersion Solid-Phase Microextraction*, DI-SPME) durante un período de tiempo.

3.1. Fundamento teórico

Cuando el polímero se pone en contacto durante un tiempo determinado con la muestra en un vial cerrado, se establece un equilibrio de tres fases: (1) el polímero de la fase sólida, (2) el espacio de cabeza sobre la fase acuosa y (3) la propia fase acuosa de manera que la extracción del analito estará relacionada con el equilibrio general de las tres fases [183]. La distribución entre fases se indica en la Ecuación 4:

$$C_0V_s = C_h^\infty V_h + C_s^\infty V_s + C_f^\infty V_f \quad \text{Ecuación 4}$$

Dónde: C_0 es la concentración inicial del analito en la muestra y C_h , C_s , C_f las concentraciones de equilibrio del analito en espacio de cabeza, la muestra y en la fase sólida, respectivamente; V_h , V_s y V_f son los volúmenes del espacio de cabeza, la muestra y la fase sólida, respectivamente.

Las constantes de partición entre la fase sólida y la fase acuosa K_{fs} , el espacio de cabeza y la fase acuosa K_{hs} y la fase sólida y espacio de cabeza K_{fh} para un determinado analito, se definen en las siguientes ecuaciones:

$$K_{fh} = \frac{C_f}{C_h} \quad \text{Ecuación 5} \quad K_{hs} = \frac{C_h}{C_s} \quad \text{Ecuación 6} \quad K_{fs} = \frac{C_f}{C_s} \quad \text{Ecuación 7}$$

Como resultado, la cantidad de analito ad/absorbida en condiciones de equilibrio por la fase sólida puede expresarse como:

$$n_f = \frac{K_{fs} V_f V_s C_0}{K_{fs} V_f + K_{hs} V_h + V_s} \quad \text{Ecuación 8}$$

3.2. Etapas del proceso

El proceso de microextracción en fase sólida se realiza en dos etapas, tal como se indica en la Figura II.B.3 [183]:

- **Extracción de los analitos.** Los analitos que se encuentran inicialmente en la muestra se transfieren a la fase sólida, por inmersión directa de la fibra o exposición al espacio de cabeza. Algunos factores que afectan a la eficacia de extracción son el volumen de muestra, la temperatura y agitación de la muestra durante el proceso, el tipo de fase, etc.
- **Desorción de los analitos que se encuentran en la fase sólida.** Este proceso implica su inserción en el inyector del cromatógrafo de gases a alta temperatura, el uso de una unidad de desorción térmica o bien, el uso de disolventes orgánicos afines a los analitos.

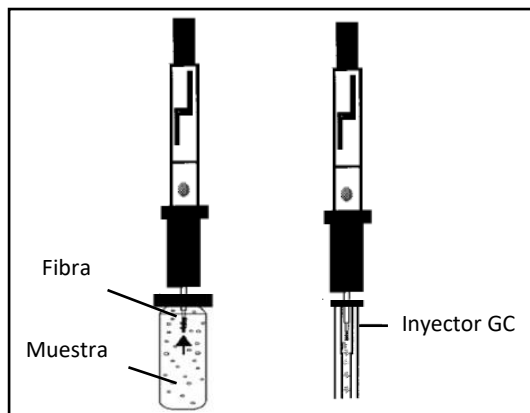


Figura II.B.3: Esquema del proceso de SPME.

3.3. Dispositivos

El dispositivo más utilizado para realizar microextracciones en fase sólida es la fibra de SPME, que consiste en una jeringa con una fibra de sílice fundida en su interior sobre la que se deposita el material polimérico donde tiene lugar la extracción. Los materiales que se suelen emplear son polidimetilsiloxano (PDMS) como fase apolar y poliacrilato (PA), divinilbenceno (DVB) o polietilenglicol (PEG) como fases polares. Otro dispositivo comercial es el *Twister*[®], utilizado para microextracción en fase sólida con barra agitadora (*Stir Bar Sorptive Extraction*, SBSE). Recientemente, Kabir y col. [184] han patentado la extracción con polímeros modificados químicamente (*Fabric Phase Sorptive Extraction*, FPSE), que consiste en la retención de los analitos sobre un soporte inerte modificado químicamente empleando la tecnología sol-gel [185].

Debido al elevado coste de alguno de los dispositivos anteriores, los problemas de efectos de memoria por la reutilización de las fases extractantes, y a la escasa variedad de fases sólidas en el caso de los *Twister*[®], es frecuente el uso de dispositivos no comerciales basados en el uso de polímeros adsorbentes/absorbentes de grado técnico como polidimetilsiloxano (PDMS), poliétersulfona (PES) o polipropileno (PP), considerados de un solo uso debido al bajo coste que presentan (0.4 € por unidad), evitando así problemas de contaminación entre muestras [186].

3.4. Otras aplicaciones de las técnicas de microextracción

Además del uso convencional de estos dispositivos para la extracción de los analitos de una muestra y su posterior determinación en el sistema cromatográfico con fines cualitativos o cuantitativos, en los últimos años se han desarrollado nuevas aplicaciones para los materiales utilizados en las técnicas de microextracción. Se han diseñado pulseras de silicona para su uso como muestreadores pasivos con el fin de examinar la exposición ambiental a compuestos utilizados en productos de cuidado personal, procesos industriales y de consumo general [187]. De igual forma, se han realizado muestreos de compuestos retardantes de llama organofosforados empleando toallitas de mano, obteniendo resultados similares a los alcanzados al realizar el muestreo con las pulseras de silicona [188]. Otra de las aplicaciones de estos ad/absorbentes consiste en la medida de contaminantes orgánicos persistentes en implantes mamarios de silicona con el fin de estudiar la exposición a estos compuestos considerados un riesgo para la salud por su acumulación en tejidos humanos, interfiriendo con el sistema endocrino [189].

También se han desarrollado aplicaciones utilizando anillos tóricos de silicona para realizar ensayos de toxicidad de compuestos orgánicos hidrofóbicos, evitando así pérdidas por volatilización o por adsorción de los compuestos en los pocillos de las placas de cultivo celular o de microorganismos que se utilizan frecuentemente para realizar estos experimentos [190,191]. La desorción de los compuestos a evaluar, con una cinética constante desde estos dispositivos, permite controlar la dosis a la que se exponen estos microorganismos.

Otro de sus usos, consiste en el empleo de estos dispositivos como soporte, o matriz, para realizar estudios de degradación, ya que ofrecen ventajas como su bajo coste o la posibilidad de realizar un estudio rápido con un mínimo consumo de disolventes orgánicos. Además de esto, con el uso de estos materiales, disminuye la posibilidad de producir pérdidas de los productos de degradación, lo contrario de lo que puede ocurrir con estudios realizados con técnicas multietapa. Una de las primeras aplicaciones ha sido desarrollada por Lores y col. [192] para realizar estudios de fotodegradación de bifenilos policlorados utilizando la fibra de SPME. Para esto, la irradiación de los compuestos se produce después

de su extracción, cuando se encuentran en la fibra, generándose los productos de degradación en la propia fibra antes de insertarse en el inyector del cromatógrafo de gases. Otras aplicaciones en las que también se ha utilizado la fibra de SPME son las desarrolladas por Fernández-Álvarez y col. [193,194] para la extracción y fotodegradación de insecticidas piretroides.

En esta Tesis se ha evaluado por primera vez el uso de polímeros de bajo coste como siliconas, utilizados como soporte para realizar estudios de fotodegradación de pesticidas, exponiendo esos materiales en los que se encuentran ad/absorbidos los analitos tanto a radiación UV en experimentos de laboratorio, como a condiciones ambientales, retirando soportes a distintos tiempos de exposición desde horas hasta varios días [195].







II.C. TÉCNICAS DE DETERMINACIÓN



1. ESPECTROMETRÍA DE MASAS

A partir de la década de los 80, la espectrometría de masas (MS) se ha utilizado cada vez más en la caracterización analítica de alimentos, para conocer la presencia de contaminantes orgánicos, micro y macronutrientes y otros componentes de los mismos. MS ha sido acoplada a técnicas cromatográficas incluyendo la cromatografía de gases (GC) y la cromatografía de líquidos (LC), dependiendo de la naturaleza de la amplia gama de compuestos estudiados, con valores de polaridad y volatilidad diferentes. Además, en los últimos años, con los nuevos avances en el diseño de instrumentos de espectrometría de masas, que ofrecen una mayor sensibilidad con una mejor resolución, se han desarrollado aplicaciones para la identificación y determinación estructural de compuestos que ayudan a controlar la calidad de los alimentos.

1.1. Analizadores

El analizador es una de las partes fundamentales del espectrómetro de masas. Su función es separar los iones una vez expulsados de la fuente, dependiendo de la relación masa/carga (m/z) de cada uno, para detectarlos de manera individual. Los analizadores más utilizados son el cuadrupolo y la trampa de iones. Además de éstos, en esta Tesis también se ha trabajado en la determinación y caracterización de contaminantes, productos naturales y sus productos de transformación en vino y en matrices ambientales, utilizando analizadores de tipo tiempo de vuelo (TOF).

1.1.1. Analizador cuadrupolar

Los analizadores cuadrupolares están formados por cuatro barras cilíndricas colocadas de manera paralela, con una sección transversal hiperbólica por donde pasan los iones. Cada par de barras, diagonalmente opuestas, está conectada eléctricamente entre sí, a una fuente de corriente alterna de radiofrecuencia (RF) y otra de corriente continua (CC). Los iones son extraídos de la fuente, aplicando un pequeño potencial, e introducidos en el

espacio central del analizador entre las cuatro barras. Sólo aquellos que tengan un valor m/z determinado, dependiendo de la combinación entre la energía RF y la CC, incidirán en el detector, mientras que los demás se desviarán hasta colisionar con las barras perdiendo su carga [196]. En la Figura II.C.1 se muestra un esquema del analizador de tipo cuadrupolo.

Con este tipo de analizadores se puede trabajar en dos modos de adquisición de datos: *full scan*, en el que se hace un barrido completo de energías de manera que todos los iones en un rango de relaciones m/z pasan secuencialmente al detector, o en modo SIM (*Selected Ion Monitoring*), en el que sólo se registran los iones seleccionados, logrando así una mayor sensibilidad debido a la eliminación de interferencias y a que un mayor número de iones con una relación m/z dada, alcanzan el detector.

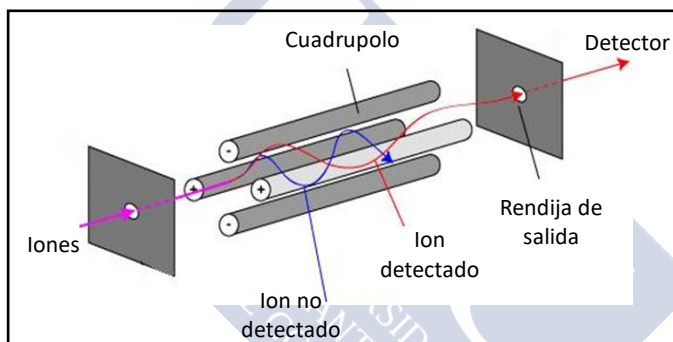


Figura II.C.1: Esquema del analizador de tipo cuadrupolo.

La principal ventaja que presenta este tipo de analizador es que debido a que trabaja sólo con campos eléctricos, los barridos espectrales pueden ser muy rápidos. Además de eso, la escala de masas es lineal con respecto a los potenciales empleados de manera que en los espectros obtenidos pueden realizarse interpolaciones de masa fácilmente. El problema del cuadrupolo es la baja resolución que presenta y el limitado rango de relaciones m/z que puede separar.

1.1.2. Analizador de trampa de iones

La trampa de iones es un dispositivo que funciona utilizando un campo cuadrupolar de radiofrecuencias para atrapar iones en su interior, en una órbita estable. En una segunda etapa, los iones son expulsados secuencialmente hacia el detector en función de su relación m/z . Las trampas de iones se pueden clasificar en dos tipos dependiendo del número de dimensiones en las que atrapan los iones. De esta manera, existe la *trampa de iones 3D*, la primera en comercializarse, denominada también trampa de iones cuadrupolo (QIT) o trampa de iones de Paul, en honor Wolfgang Paul, por cuyo invento recibió el Premio Nobel de Física de 1989. Estas trampas de iones están compuestas por un electrodo anular con dos electrodos terminales que crean un campo cuadrupolar en tres dimensiones. También se utiliza la *trampa de iones 2D*, conocida como trampa de iones lineales (LIT). Este tipo de analizador está formado por un cuadrupolo que termina en lentes, creando un campo cuadrupolar en dos dimensiones, de manera que los iones se oscilan hacia delante y hacia atrás de ese cuadrupolo, siendo atrapados en su interior [197,198]. En la Figura II.C.2 se muestra la configuración del analizador de trampa de iones en la versión 3D.

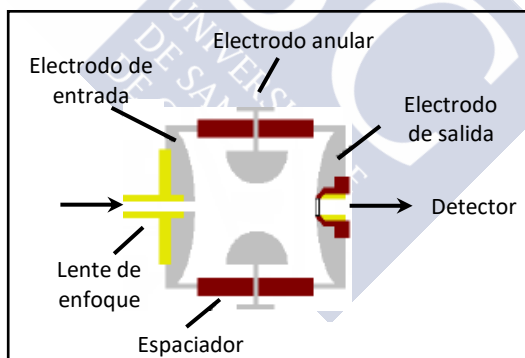


Figura II.C.2: Esquema del analizador de trampa de iones (tipo QIT).

Los analizadores de trampa de iones son robustos, más económicos que otros instrumentos, como el analizador cuadrupolar y pueden alcanzar límites de detección (LOD) bajos. Como inconveniente, hay que señalar que, debido a la alta concentración de iones en el interior de la trampa, es frecuente la existencia de reacciones entre ellos, lo que puede dar lugar a espectros con esquemas de fragmentación diferentes a los que se obtienen con otros

analizadores. Esta limitación se ha superado, en parte, aplicando tiempos de ionización variables. Aun así, las trampas de iones tridimensionales tienen, en el momento actual, una importancia decreciente en aplicaciones cuantitativas.

1.1.3. Analizador de tiempo de vuelo

Los analizadores de tiempo de vuelo (*time-of-flight*, TOF) utilizan un pulso de potencial eléctrico para acelerar los iones generados en la fuente hacia el tubo de vuelo, lo que, teóricamente, proporciona a todos los iones una misma energía. La relación m/z determina el tiempo requerido por cada uno de los iones para alcanzar el detector según la ecuación $t=k\sqrt{m/z}$, siendo k una constante que recoge los parámetros del diseño del analizador. En la práctica, no todos los iones con los mismos valores m/z pueden alcanzar una velocidad ideal por lo que, se añade en este tipo de analizador un reflectrón. Éste consiste en una serie de electrodos anulares a diferentes potenciales al final del tubo de vuelo. De esta manera, los altos voltajes reflejarán los iones en la dirección opuesta a la de entrada, reduciendo el rango de tiempos de vuelo para iones con igual relación m/z , aumentando así la resolución. En resumen, el reflectrón amortigua las diferencias en las velocidades de iones con igual relación m/z cuando entran en el tubo de vuelo haciendo que ambos alcancen el detector al mismo tiempo [199]. En la Figura II.C.3 se muestra un esquema del analizador de tiempo de vuelo.

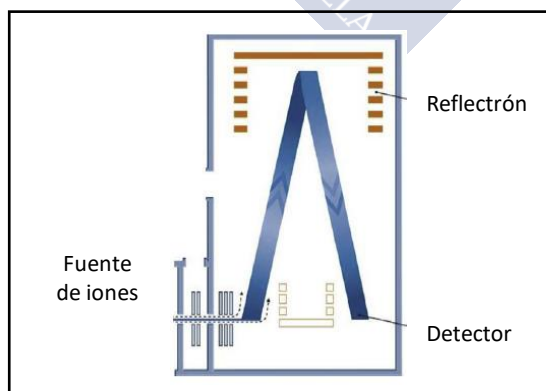


Figura II.C.3: Esquema del analizador tiempo de vuelo.

Los analizadores de tiempo de vuelo presentan importantes ventajas sobre los cuadrupolos y las trampas de iones como son, un ciclo de separación rápido y el amplio rango de m/z de iones que se pueden separar, por lo que se pueden utilizar para moléculas de elevado peso molecular. Además, permiten obtener relaciones m/z con exactitudes en la región de los bajos mDa.

1.2. Espectrometría de masas en tándem

El término espectrometría de masas en tándem (*tandem mass spectrometry*, MS/MS) se aplica a cualquier equipo general que implique al menos dos etapas de análisis de masa. Generalmente, si se trabaja con cuadrupolos en MS/MS, se emplea un primer analizador para aislar un ion precursor, el cual experimenta una fragmentación posterior para producir iones producto y fragmentos neutros, siendo separados los primeros en el segundo analizador de masas. Es posible aumentar el número de pasos de manera que se pueden seleccionar iones de una primera masa, después seleccionar iones de una segunda masa de los fragmentos obtenidos y finalmente, analizar estos últimos fragmentos obtenidos, lo que sería un experimento MS/MS/MS o MS³. El número de pasos se puede aumentar obteniendo así un experimento MSⁿ (donde n se refiere al número de generaciones de iones que se analizan). Con analizadores tipo trampa de iones (trampas 3D, 2D y Orbitrap), es posible realizar todo el proceso utilizando un único analizador.

En la Figura II.C.4 se muestra el proceso MS² en el que un ion M1 es seleccionado por el primer analizador MS1, fragmentado y los fragmentos analizados por el segundo analizador MS2 [197].

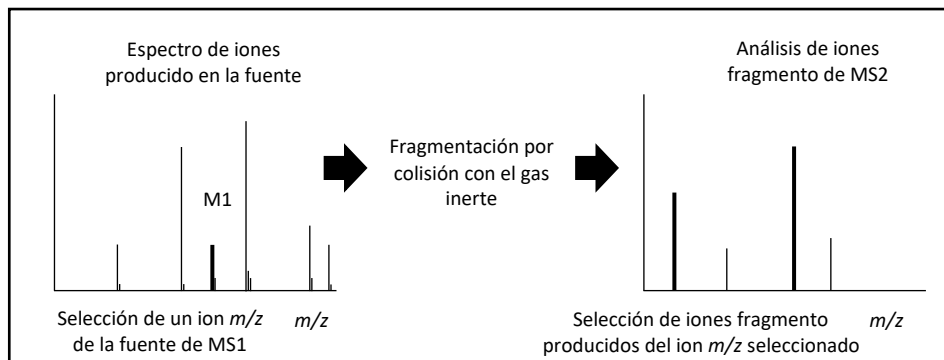


Figura II.C.4: Principio de MS/MS.

Los sistemas de masas en tándem se dividen en dos grupos según el modo de funcionamiento de los analizadores de masas que configuren el equipo de MS/MS. Un grupo corresponde al tándem en tiempo (*tandem-in-time*), entre los que se encuentran las trampas de iones lineales y cuadrupolares, así como las trampas orbitales (Orbitrap) que operan de manera que los iones formados en la región de ionización se aíslan, se fragmentan y se separan de acuerdo con su relación m/z en el mismo espacio físico. Las reacciones de fragmentación de los iones preseleccionados y su posterior análisis (separación) ocurren en función del tiempo, permitiendo así el registro sucesivo de iones producto hasta MS_n. El segundo grupo corresponde al tándem en espacio (*tandem-in-space*), en los que no sólo es posible el estudio de iones producto sino también de los iones precursores, de las reacciones entre dos iones relacionados o el registro de la pérdida de un fragmento neutro. A este grupo pertenecen los analizadores triple cuadrupolo (QqQ) y las configuraciones de MS/MS híbridas que combinan varios analizadores de diferente naturaleza, como es el caso del cuadrupolo-tiempo de vuelo (QTOF) [200].

1.2.1. Triple cuadrupolo

El espectrómetro de masas triple cuadrupolo presenta una disposición en tándem espacial, tal y como se indica en la Figura II.C.5, en la que el primer y tercer cuadrupolo (Q) actúan como analizadores máscicos cuadrupolares tradicionales (MS₁, Q₁ y MS₂, Q₂) en

modo de barrido completo (*full scan*), o registro del ion seleccionado (SIM), en formas independientes o enlazadas, y el segundo cuadrupolo (q) funciona como celda de colisión. Habitualmente, en aplicaciones cuantitativas, el primer cuadrupolo se utiliza para la selección de iones precursores después de la etapa de ionización, de manera que se transmiten a la celda de colisión (q) con una entrada de un gas inerte (He, Ar o N₂) que interacciona con los iones provocando su fragmentación, proceso que recibe el nombre de disociación inducida por colisión (*collision-induced dissociation*, CID) y transmite estos iones del analizador Q1 al Q3, en donde se analizan los productos que emergen [196,200].

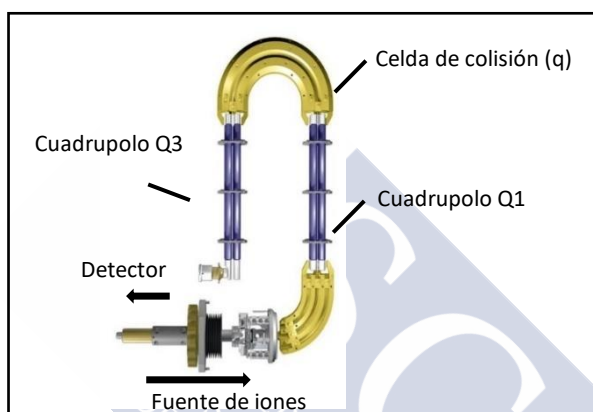


Figura II.C.5: Esquema del espectrómetro de masas triple cuadrupolo.

1.2.2. Cuadrupolo-Tiempo de vuelo

En la configuración del espectrómetro de masas cuadrupolo-tiempo de vuelo (QTOF) el tercer cuadrupolo (Q3) es reemplazado por un analizador TOF, como se muestra en la Figura II.C.6 [199,201].

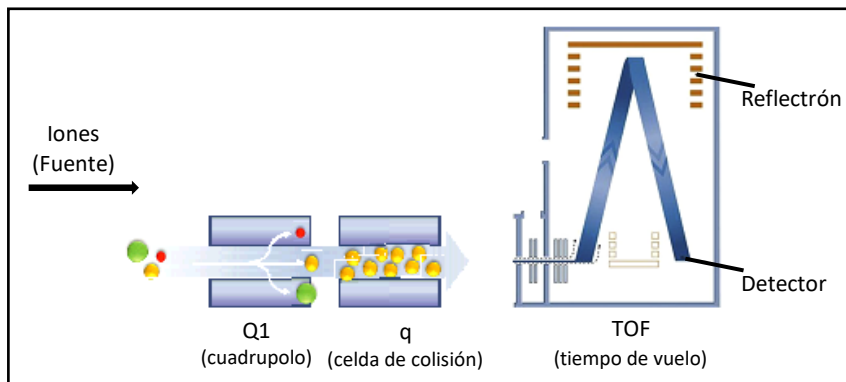


Figura II.C.6: Esquema del espectrómetro de masas cuadrupolo-tiempo de vuelo.

Las ventajas que ofrece el instrumento QTOF, son el alto poder de resolución, la medición exacta de las relaciones m/z y la alta sensibilidad en barrido completo (*full scan*), que lo convierten en una herramienta muy potente para llevar a cabo tanto la identificación y cuantificación de compuestos conocidos (*target analysis*) como el análisis de otros desconocidos presentes en la muestra (*non-target analysis*). Este sistema tiene la capacidad de registrar un número ilimitado de iones operando en modos *full scan* (MS) y *product ion scan*, lo que hace que esta técnica sea útil para el desarrollo de estrategias de cribado o *screening* basadas en la búsqueda de los iones que aparecen en los espectros de masas, o masas-masas, en librerías de espectros [199].

2. ACOPLAMIENTO ESPECTROMETRÍA DE MASAS-TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

Con el fin de analizar muestras complejas, es frecuente acoplar el espectrómetro de masas con una técnica de separación cromatográfica, como GC o LC. Los compuestos separados se introducen en el espectrómetro en estado gaseoso, en el caso de GC-MS, o en disolución en el de LC-MS [197].

2.1. Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas (GC-MS)

La cromatografía de gases (GC) es una técnica de separación de compuestos volátiles o semivolátiles, con puntos de ebullición menores de 450 °C. La separación se produce por distribución de los analitos entre una fase estacionaria, que consiste en un sólido o líquido inmovilizado sobre un soporte sólido o sobre las paredes de la columna, y una fase móvil gaseosa inerte químicamente, con la única función de transportar los analitos [202]. Cuando la fase estacionaria es un sólido, se trata de cromatografía gas-sólido (GSC), utilizada para la separación de los analitos mediante mecanismos de adsorción sobre la superficie de la fase estacionaria, mientras que si la fase es un líquido de alto punto de ebullición se denomina cromatografía gas-líquido (GLC), en la que el mecanismo de separación consiste en la absorción de los analitos sobre la fase estacionaria. Debido a que el mecanismo de adsorción da lugar a la retención semipermanente de los analitos, GSC no presenta otras aplicaciones que no sean la separación de especies gaseosas de bajo peso molecular [203].

A continuación, se indican los principales componentes a tener en cuenta en una separación por GC-MS. Además, se han incluido algunas aplicaciones de esta técnica para los compuestos estudiados en esta Tesis.

2.1.1. Columnas para GC-MS

Las columnas que se emplean en GC son, por una parte, las columnas de relleno, fabricadas con tubo de vidrio, metal o Teflón, con una longitud de 1 a 3 m y un diámetro interno de 2 a 4 mm, empaquetadas con un material relleno sólido y cubiertas con una fina capa (0.05 a 1 μm) de fase estacionaria y por otra, las columnas capilares, fabricadas frecuentemente de sílice fundida con un diámetro interno de 100 a 750 μm y una longitud variable entre 2 y 60 m, siendo la más frecuente la de 30 m, sobre la que se deposita una capa de fase estacionaria, de 0.1 a 5 μm . Las columnas que se utilizan en el acoplamiento GC-MS son las capilares, con un diámetro interno entre 250 y 320 μm , para las que se recomienda un espesor de fase estacionaria de 0.25 μm . Estas columnas emplean flujos muy bajos de gas portador, entre 1 y 2 mL min^{-1} , lo que permite la conexión directa al espectrómetro de masas sin que se vea afectado el vacío del sistema. Las fases estacionarias más empleadas son polidimetilsiloxano (PDMS), poli(fenildimetil)siloxano (5% fenil), poli(fenildimetil)siloxano (50% fenil), poli(trifluoropropildimetil)siloxano, polietilenglicol (PEG) y poli(dicianoalildimetil)siloxano [196,203].

2.1.2. Inyección de la muestra

La introducción de la muestra en los sistemas GC-MS, con columnas capilares, se puede llevar a cabo en cuatro modos de inyección: volatilización de la muestra empleando un sistema divisor de flujo (*split*) o sin división de flujo (*splitless*), empleando vaporización con programación de temperatura (PTV) e inyección en columna (*on-column*).

El más popular entre los instrumentos que utilizan columnas capilares es el inyector *split/splitless*. Este tipo de inyector se mantiene a una temperatura constante y relativamente elevada, después de introducir la muestra (1 o 2 μL) y su posterior volatilización. Puede trabajar en modo *split*, de manera que una pequeña fracción conocida de la muestra entra en el sistema mientras que el resto se desecha por la válvula de división (válvula de *split*); o sin división de flujo (modo *splitless*), manteniendo la válvula de *split* cerrada durante 30 o 60 segundos, haciendo que todo el vapor de la muestra pase a ser

concentrado en cabeza de columna. Posteriormente, esta válvula se abre y el gas portador arrastra compuestos poco volátiles que hayan quedado en la cámara de vaporización eliminándolos, preferentemente, por la salida de *split* [202]. En este tipo de inyectores también se puede aplicar pulso de presión durante la inyección, reduciendo la expansión del disolvente y, por lo tanto, disminuyendo el ancho de banda en cabeza de columna, reduciendo la probabilidad de pérdidas e incrementando la eficacia de la inyección para compuestos poco volátiles [204,205].

Los inyectores PTV se utilizan para la inyección de grandes volúmenes de muestra. El inyector es similar al descrito anteriormente de *split/splitless*, con la diferencia de que la muestra se introduce con el inyector en frío y a continuación, la temperatura aumenta de forma programada para evaporar primero la mayor parte del disolvente (manteniendo la válvula de *split* abierta). Posteriormente se incrementa de manera rápida la temperatura, al tiempo que se pasa el inyector a modo *splitless*, para introducir los compuestos en columna [202,205].

En el modo de inyección en columna, la muestra líquida se inyecta a baja temperatura en la columna y después se evapora al programar la temperatura en cabeza de columna. No debe utilizarse con muestras complejas ya que pueden provocar contaminación en la columna por componentes no volátiles [202,203]. Su principal ventaja es que minimiza la degradación de compuestos termolábiles.

2.1.3. Modos de ionización

Las técnicas de ionización en GC-MS están restringidas a aquellas compatibles con analitos en fase gaseosa, tales como la ionización electrónica (EI) y la ionización química (CI). En ambos casos, la generación de iones tiene lugar en condiciones de vacío.

Las fuentes de ionización electrónica (EI) están formadas por un filamento caliente de tungsteno o renio que emite electrones que son acelerados por un potencial, normalmente de 70 V, aplicado entre el filamento y el ánodo. Los electrones y las moléculas se encuentran en ángulo recto por lo que se cruzan en el centro de la fuente, colisionando y

causando la pérdida de electrones en las moléculas por repulsiones electrostáticas, obteniendo iones con una única carga positiva. La ionización electrónica proporciona un patrón característico de fragmentación, o huella química, que puede utilizarse como base para la identificación de compuestos empleando librerías como la suministrada por el Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (*National Institute of Standards and Technology*, NIST) [203]. A día de hoy, los espectros en esta base de datos se encuentran registrados a baja resolución.

En ionización química (CI), las moléculas de la muestra se ionizan por colisión con los iones primarios producidos por el bombardeo con electrones de un exceso de gas reactivo. Uno de los gases reactivos más comunes es el metano, que reacciona con electrones de energía elevada para producir varios iones que, tras su choque, dan lugar a la transferencia de protones o a la formación de aductos y, menos frecuentemente la abstracción de un hidruro. En consecuencia, los iones obtenidos con mayor abundancia son $[M+H]^+$, $[M+C_2H_5]^+$ y $[M-H]^+$, respectivamente [203]. A diferencia de lo que ocurre con EI, empleando CI se pueden generar iones con carga negativa, lo que permite obtener registros cromatográficos altamente selectivos para determinados tipos de compuestos químicos.

2.1.4. Derivatización

Cuando los analitos que se pretende separar empleando GC-MS presentan una elevada polaridad, o son termolábiles, se utilizan reacciones de derivatización, mediante las cuales, se modifican las propiedades físico-químicas de éstos, adaptándolos a los requerimientos de la técnica, consiguiendo un aumento de su volatilidad y estabilidad, mejorando así la resolución cromatográfica y evitando el solapamiento de picos [202].

Para la selección de un reactivo de derivatización y las condiciones en las que transcurre la reacción de derivatización, se han de tener en cuenta los grupos funcionales de la molécula, así como otros grupos presentes que puedan interactuar y/o consumir derivatizante (por ejemplo, los existentes en las moléculas del disolvente). Por lo general, las reacciones más habituales son las de sililación, acilación y alquilación. En esta Tesis, para la

determinación de estilbenos en vino, se ha recurrido a la derivatización de los grupos funcionales polares como son los grupos hidroxilo unidos al anillo aromático (-OH), por medio de reacciones de sililación con *N,O*-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) y acilación con anhídrido acético (acetilación) en medio básico.

2.1.5. Aplicaciones de GC-MS a la determinación de los compuestos estudiados en vino

GC acoplada a espectrometría de masas, con analizador cuadrupolar, es una de las técnicas más empleadas para el análisis de residuos de pesticidas en aplicaciones ambientales, alimentarias y biológicas [206]. En algunos casos, debido a las interferencias en la medida producidas por otros componentes de la muestra que dificultan la identificación y cuantificación de los analitos, es útil el uso de GC-MS/MS para el análisis de residuos de pesticidas ya que proporciona un aumento de la selectividad y, por lo tanto, una confirmación más segura a la hora de su identificación [207,208]. Otra posibilidad para aumentar la selectividad es emplear relaciones *m/z* exactas. En esta memoria de Tesis se recoge un método multianalito para la determinación de compuestos semivolátiles, relacionados con la calidad del vino, mediante GC-QTOF-MS. En la Tabla II.C.1 se resumen algunas aplicaciones relevantes de GC-MS a la determinación de pesticidas en vino.

En el caso de los estilbenos, la presencia de grupos fenólicos en sus estructuras puede limitar el análisis con GC-MS, por lo que, es frecuente el uso de reacciones de derivatización, habitualmente reacciones de sililación [209] y acilación [123] para llevar a cabo su separación y detección. El modo de ionización para la mayoría de las aplicaciones descritas en la bibliografía, es la ionización electrónica, como se indica en la Tabla II.C.1.

Para la determinación de OTA, LC es la técnica empleada con más frecuencia y no se han descrito aplicaciones con GC a muestras de vino, aunque sí se ha analizado en otras muestras como en cereales [210] y en cerveza [211], utilizando una etapa previa de derivatización con anhídrido trifluoroacético y la mezcla formada por BSA (*N,O*-Bis(trimetilsilil)acetamida), TMCS (Trimetilclorosilano) y TMSI (*N*-trimetilsililimidazol) (3:2:3), respectivamente.

Tabla II.C.1: Aplicaciones de GC-MS para la determinación de pesticidas y estilbenos.

Analitos	Muestra	Preparación muestra	Detección	Ionización	LOQ (ng mL ⁻¹)	Ref.
AZO, BEN, FLUD, FLU, IPR, MET, PR, PYR, PY, TEB, THM	Vino tinto	SPE	GC-MS (Q)	EI	0.01 - 25	[65]
MET, TRI, PRY, MYC, FLU, PR, TEB, DIF	Vino tinto y blanco	DLLME	GC-MS (Q)	EI	0.13 - 2	[173]
AZO, END	Vino rosado y blanco	SDME	GC-MS (Q)	EI	3.19 - 3.96	[68]
IP	Vino tinto y blanco	LLE	GC-IT-MS	CI	39	[52]
<i>t</i> -RESV	Vino tinto	SPME	GC-MS (Q)	EI	0.007	[212]
<i>t</i> -RESV, <i>c</i> -RESV, <i>t</i> -PICEA	Vino rosado y blanco	SBSE	GC-MS (Q)	EI	0.014 - 0.049	[213]
<i>t</i> -RESV	Vino tinto y blanco	DLLME+SPE	GC-IT-MS	EI	0.8	[123]
<i>t</i> -RESV	Vino tinto	SPE (inyección en columna-DEP*)	GC-IT-MS	CI	-	[214]

* Sonda de exposición directa (*Direct-Exposure-Probe*, DEP)

2.2. Cromatografía de Líquidos-Espectrometría de Masas (LC-MS)

La cromatografía de líquidos (LC) es la técnica analítica de separación más utilizada para especies de elevada polaridad, no volátiles o termolábiles [203].

En esta técnica, la separación se produce dependiendo de la afinidad de los analitos por la fase estacionaria y por la fase móvil. Un factor importante es la solubilidad de los analitos en el disolvente, o mezcla de disolventes, que actúan como fase móvil, de manera que si se utilizan disolventes con una polaridad mayor a la de la fase estacionaria, la modalidad de LC seleccionada es la *fase reversa*, mientras que, si se trabaja con disolventes con una polaridad inferior a la fase estacionaria, se trata de *fase normal* [202].

2.2.1. Columnas para LC-MS

Las columnas para LC miden de 5 a 25 cm de largo, aunque en ocasiones se pueden alargar acoplando dos o más. Su diámetro interno es de 3 a 5 mm, mientras que el relleno tiene un tamaño de partícula de 3 a 5 μm . A partir de los años 80 se comenzaron a fabricar microcolumnas con longitudes de 3 a 7.5 cm, y diámetros interiores entre 1 y 4.6 mm rellenas con partículas de tamaño inferior a 2 μm , que presentan ventajas como la rapidez en el análisis, el mínimo consumo de disolvente y el fácil acoplamiento a espectrometría de masas [203].

En cuanto a la fase estacionaria empleada, la mayor parte de las aplicaciones de LC para la determinación de compuestos orgánicos se realizan en fase reversa, empleando rellenos de columna de naturaleza poco polar a base de sílice enlazada a grupos octil (C8) u octadecil (C18). En el caso de LC en fase normal, se utilizan fases estacionarias como sílice o alúmina [203,215].

2.2.2. Modos de ionización

El principal problema en el uso de LC-MS es la dificultad para acoplar ambas técnicas debido a los volúmenes relativamente grandes de fase móvil en la que se encuentran los analitos, incompatibles con las condiciones de vacío en las que trabaja el espectrómetro de masas. Para resolver este problema, históricamente se han empleado interfases con diferentes diseños. En la actualidad, las técnicas que se utilizan para la introducción de la muestra líquida en el espectrómetro de masas se pueden dividir en dos grupos, las que sólo introducen la muestra en la fuente como son las de haz de partículas (*Particle beam*, PB), y las que además ionizan la muestra, como las técnicas de ionización a presión atmosférica (*Atmospheric Pressure Ionization*, API). Las técnicas API más empleadas son la ionización por electrospray (*Electrospray Ionization*, ESI), la ionización química a presión atmosférica (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*, APCI) y la fotoionización a presión atmosférica (*Atmospheric Pressure Photoionization*, APPI) [196].

ESI es, con diferencia, la interfase más utilizada para LC-MS. Su mecanismo de ionización consiste en la aplicación de un campo eléctrico fuerte, bajo presión atmosférica, sobre el eluyente de la columna de LC. El campo eléctrico se obtiene al aplicar una diferencia de potencial entre el tubo capilar por el que pasa la muestra y un contraelectrodo. Como resultado se induce una acumulación de carga en la superficie del líquido eluyente, que, con la ayuda de un gas nebulizante, hace que la muestra se pulverice en pequeñas gotas de aerosol. Posteriormente, el volumen de las gotas se reduce por evaporación del disolvente y su posterior fragmentación, debido a la repulsión de cargas eléctricas de igual signo hasta obtener iones en fase vapor [197].

APCI es una fuente de ionización que se emplea para compuestos relativamente no polares, con peso molecular hasta 1500 Da. Es un método análogo a la ionización química utilizada en GC-MS. En este sistema la muestra, eluyente del cromatógrafo de líquidos, se introduce en un nebulizador neumático, en donde se pulveriza en pequeñas gotas tras la incidencia de una corriente auxiliar de nitrógeno a alta temperatura. Posteriormente, las gotas son desplazadas por el gas a un tubo de cuarzo caliente, llamado cámara de desolvatación/vaporización, en donde la fase móvil se evapora permitiendo que los compuestos salgan de esa cámara a través de un electrodo, teniendo lugar su ionización [197].

El mecanismo de ionización con la fuente APPI es similar al de la APCI, con la diferencia de que los analitos, después de la nebulización y evaporación de la fase móvil, interaccionan con los fotones emitidos por una lámpara, induciendo una serie de reacciones en fase gas que dan lugar a la ionización de las moléculas. Esta fuente de fotoionización se emplea para compuestos no polares, no ionizables mediante APCI ni ESI [197].

En la Figura II.C.7 se muestra un esquema de las tres fuentes API más empleadas en los acoplamientos LC-MS [216].

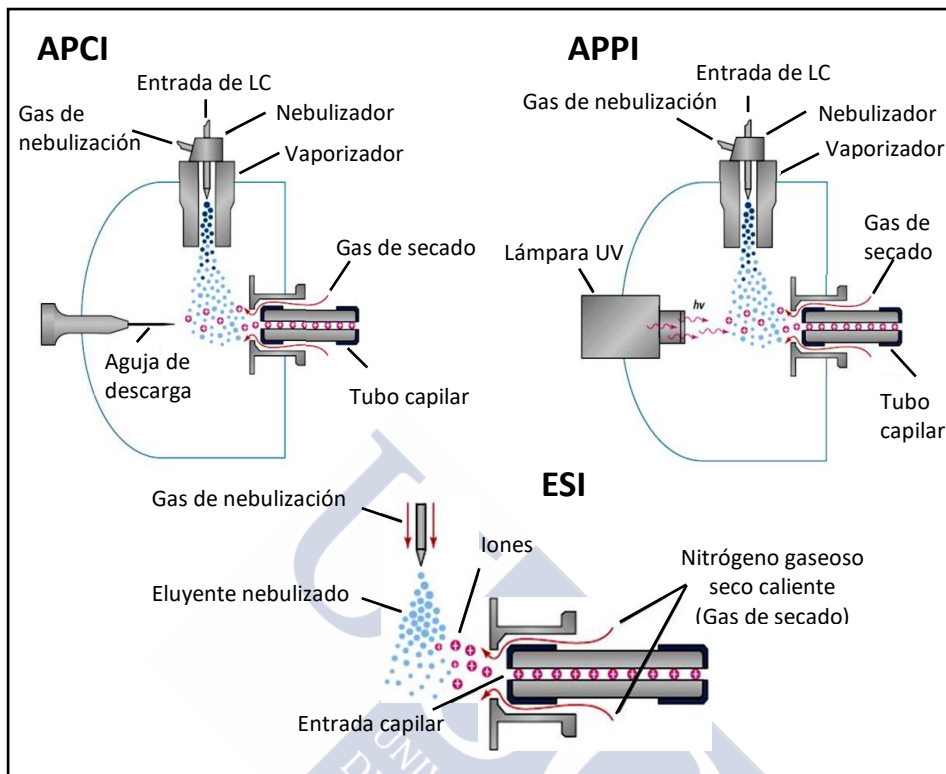


Figura II.C.7: Esquemas de las fuentes API empleadas en LC-MS.

2.2.3. Aplicaciones de LC-MS a la determinación de los compuestos estudiados en vino

En las últimas décadas, debido a la aparición de las fuentes de ionización API, se ha extendido el uso de LC-MS para la determinación de contaminantes y compuestos de origen natural en vino, puesto que permiten la cuantificación de estos analitos y la identificación de productos de degradación de naturaleza polar, relativamente poco volátiles o térmicamente lábiles que no son susceptibles a su análisis utilizando GC o que necesitan una etapa previa de derivatización [206]. Aun así, en lo referente a la determinación de residuos de pesticidas, algunas especies (ej. Folpet, PRY, IPR, etc) se ionizan con mayor eficacia en la fuente de EI (GC-EI-MS) que en las fuentes API empleadas en LC-MS. Así pues, GC-MS y LC-MS se complementan en la determinación de residuos de pesticidas en vino.

Como ventaja, LC ofrece la posibilidad de la inyección directa de la muestra o de la muestra diluida, evitando así una etapa de preparación laboriosa, aunque en la mayoría de las aplicaciones es necesaria la extracción de los analitos para evitar interferencias en la medida con otros compuestos presentes en la muestra y, sobre todo, efectos de matriz a nivel de la fuente de ESI, cuando se persiguen resultados de tipo cuantitativo. Además, con la aparición de la cromatografía de líquidos de ultra-alta eficacia (*Ultra Performance Liquid Chromatography*, UPLC), empleando columnas con tamaño de partícula inferior a 2 μm , se reduce el tiempo de ejecución del análisis.

En la Tabla II.C.2 se resumen algunas aplicaciones del acoplamiento LC-MS para la determinación de los compuestos seleccionados en esta Tesis en vino.

Tabla II.C.2: Aplicaciones de LC-MS para la determinación de pesticidas, estilbenos y OTA en vino.

Analitos	Muestra	Preparación muestra	Detección	Ionización	LOQ (ng mL ⁻¹)	Ref.
ACE, AZO, BEN, DI, FEN, IPR, MET, MYC, PEN, PYR, PRY, PRC	Vino tinto y blanco	Inyección directa	LC-QTOF-MS	ESI	0.05 - 0.5	[217]
ACE, AZO, BEN, DI, FEN, IPR, MET, MYC, PEN, PYR, PRY, PRC	Vino tinto y blanco	Inyección directa	LC-QqLIT-MS	ESI	0.01 - 0.5	[217]
AZO, DIF, MET, PEN, DI, PR, FLU, TEB, MYC	Vino tinto y blanco	SPE	LC-QqQ-TOF	ESI	0.01 - 0.79	[63]
OTA	Vino tinto	QuEChERS	UPLC-QqQ-MS	ESI	1	[218]
OTA	Vino tinto, rosado y blanco	SPE	LC-Q-LIT-MS	ESI	30	[219]
<i>t</i> -RESV, <i>t</i> -PICE, <i>t</i> -PICEA	Vino tinto y blanco	Inyección directa	LC-QqQ-TOF	APCI	160 - 167	[126]
<i>t</i> -RESV, <i>c</i> -RESV	Vino tinto, rosado y blanco	Inyección directa	TFC*-LC-IT-MS	APCI	6 - 113	[220]
<i>t</i> -RESV	Vino tinto	MIP-SPE	LC-IT-MS	ESI	29.4	[221]

* Cromatografía de flujo turbulento (*Turbulent-Flow Chromatography*, TFC)

2.3. Uso del acoplamiento Espectrometría de Masas-Técnicas Cromatográficas en estudios de transformación

En los últimos años, se ha buscado el desarrollo de nuevas metodologías que permitan el análisis simultáneo de un gran número de contaminantes orgánicos, enfocados generalmente a su aplicación en matrices ambientales o alimentarias, que abarcan un amplio número de muestras de distinta naturaleza, con una gran variedad de compuestos de diferentes familias químicas potencialmente peligrosos. La mayoría de estos métodos están enfocados a la cuantificación de compuestos previamente seleccionados (*target analysis*), excediendo en ocasiones los 100 compuestos por lo que es frecuente que este tipo de análisis no proporcione una visión completa del nivel de contaminación en una muestra [222].

En los últimos años se han desarrollado nuevos métodos y técnicas capaces de detectar, identificar e incluso cuantificar un mayor número de contaminantes y residuos orgánicos desconocidos, es decir, que no son pre-seleccionados *a priori* (*non-target analysis* o *screening*) [223]. Para este tipo de análisis, el uso de espectrómetros de alta resolución (*High-Resolution Mass Spectrometry*, HRMS) y/o capaces de medir masas exactas, por ejemplo, Orbitrap o TOF permiten una identificación más fiable de los analitos. Este tipo de analizadores permite resolver las señales de los analitos de interés y de muchos compuestos interferentes que co-eluyan con la misma masa nominal, debido a las diferencias en su masa exacta, evitando falsos positivos o negativos en algunas muestras [224]. Además, con el uso de analizadores híbridos como QTOF, LIT-Orbitrap se obtiene información adicional para confirmar la presencia de los analitos estudiados en las muestras analizadas y/o elucidar la estructura de compuestos conocidos y desconocidos, debido a que permiten realizar medidas de masa con una exactitud adecuada, combinado con la posibilidad de obtener el espectro de los iones fragmento, también con alta resolución y exactitud de masas [225,226]. En el caso de compuestos desconocidos, se realiza un análisis retrospectivo *post-target*, que implica una búsqueda en librerías de espectros de alta resolución, comparando la masa exacta medida del desconocido con la masa teórica de la base de datos, aumentando en gran medida la fiabilidad de la identificación en las muestras [227].

En esta Tesis se ha utilizado la combinación LC-QTOF-MS para investigar las rutas de transformación de pesticidas en disolución, en presencia de cloro y nitratos, y mediante el uso de siliconas como soporte de estos compuestos, así como las rutas de fotólisis en disolución, todo ello, en distintas condiciones experimentales. Asimismo, teniendo en cuenta las ventajas que ofrecen los analizadores híbridos, se ha utilizado esta combinación como técnica de *screening* para la elucidación estructural de compuestos desconocidos inicialmente.

El primer paso en estos estudios de transformación ha sido la inyección de alícuotas de muestra, antes de haberla sometido a ningún tratamiento (tiempo cero), y a distintos tiempos de reacción. La búsqueda de productos de transformación se realiza de manera automática con el *software* MassHunter Qualitative Analysis® (*Agilent Technologies*) con la función *Find by Molecular Feature*, generándose un archivo con los tiempos de retención y las relaciones de *m/z* exactas que corresponden a entidades moleculares (clúster de iones compatibles con una determinada fórmula empírica) en los experimentos de control y aquellos en los que se espera la transformación de los analitos (por ej. fotólisis, cloración, etc.), cuya señal en LC-MS sobrepase un determinado umbral.

Posteriormente, estos archivos se comparan automáticamente detectando las diferencias entre los controles y los experimentos. En nuestro caso se usó el *software* Mass Profiler, también proporcionado por *Agilent Technologies*, generando una salida gráfica en la que se resaltan los picos con intensidades variables a distintos tiempos de reacción. Este *software* también asigna a cada pico cromatográfico una fórmula empírica en base a la masa exacta y la distribución isotópica del ion molecular, dentro de una ventana de masas prefijada (por ej. 10 ppm). Para finalizar, se adquieren los cromatogramas MS/MS para cada uno de esos picos cromatográficos con el fin de adquirir información sobre su modo de fragmentación y de esa manera, ser capaces de proponer su estructura [228]. En ocasiones, el uso de especies marcadas isotópicamente (^{13}C o ^2H), facilita la identificación de las estructuras correspondientes a los distintos productos de transformación.



II.D. BIBLIOGRAFÍA



- [1] FAO, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura. Código Internacional de Conducta para la Distribución y Utilización de Plaguicidas, (2002).
- [2] L.M.L. Nollet, H.S. Rathore (Eds.), Handbook of pesticides. Methods of Pesticides residues analysis, CRC Press. Taylor & Francis Group, Florida, 2009.
- [3] D. Fernández-Calviño, J.A. Rodríguez-Suárez, E. López-Periago, M. Arias-Estévez, J. Simal-Gándara, Copper content of soils and river sediments in a winegrowing area, and its distribution among soil or sediment components, *Geoderma* 145 (2008) 91-97.
- [4] T. Stadler, Insecticidas, Breve Enciclopedia del Ambiente. Fundación CRICYT. <http://www.cricyt.edu.ar/enciclopedia/terminos/Insecticidas.htm>.
- [5] CASAFE, Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes. Insecticidas y acaricidas, 389-393.
- [6] S.D. Buckingham, B. Lapied, H. Le Corronc, F. Grolleau, D.B. Sattelle, Imidacloprid actions on insect neuronal acetylcholine receptors, *J. Exp. Biol.* 200 (1997) 2685-2692.
- [7] K. Nagata, J.H. Song, T. Shono, T. Narahashi, Modulation of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor channel by the nitromethylene heterocycle Imidacloprid, *J. Pharm. Exp. Ther.* 285 (1998) 731-738.
- [8] E.R. Robles, R.S. de la Cruz, Clasificación y uso de los herbicidas por su modo de Acción, Folleto Técnico N°. 35 INIFAP (Instituto nacional de investigaciones forestales, agrícolas y pecuarias).
- [9] J.C. Caseley, Manejo de malezas para países en desarrollo (Estudio FAO Producción y Protección Vegetal - 120) Documentos técnico de la FAO, Roma, 1996. <http://www.fao.org/docrep/T1147S/t1147s0e.htm>.
- [10] EUROSTAT, Oficina europea de la estadística. Agriculture, forestry and fishery statistics, 2016.
- [11] Ministerio de Agricultura Alimentación y Medio Ambiente, Resultados Encuesta de Comercialización 2015, <http://www.mapama.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/agricultura/estadisticas-medios-produccion/fitosanitarios.aspx#>.
- [12] A. Reynier, Manual de viticultura, 6ª Ed, Mundi-Prensa, Madrid, 2002.

- [13] O. Adam, P.M. Badot, F. Degiorgi, G. Crini, Mixture toxicity assessment of wood preservative pesticides in the freshwater amphipod *Gammarus pulex* (L.), *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72 (2009) 441-449.
- [14] G. Schenk, H. Rothweiler, C. Schlatter, Human exposure to airborne pesticides in homes treated with wood preservatives, *Indoor Air.* 7 (1997) 135-142.
- [15] A. Sapcanin, M. Cakal, B. Imamovic, M. Salihovic, E. Pehlic, Z. Jacimovic, G. Jancan, Herbicide and pesticide occurrence in the soils of children's playgrounds in Sarajevo, Bosnia and Herzegovina, *Environ. Monit. Assess.* 188 (2016) 450-455.
- [16] P. Katiyar, S. Mishra, D. Singh, L. Chandra, A. Srivastava, A.K. Saxena, Development of insecticide-incorporated knitted fabric having long-lasting efficiency, *J. Ind. Text.* 45 (2016) 531-542.
- [17] L.P. Naeher, D.B. Barr, N. Rithmire, J. Edwards, A.K. Holmes, L.L. Needham, C.S. Rubin, Pesticide exposure resulting from treatment of lice infestation in school-aged children in Georgia, *Environ. Int.* 35 (2009) 358-362.
- [18] M.B. Dyk, Z. Chen, S. Mosadeghi, H. Vega, R. Krieger, Pilot biomonitoring of adults and children following use of Chlorpyrifos shampoo and flea collars on dogs, *J. Environ. Sci. Health. B.* 46 (2011) 97-104.
- [19] D. Stanneck, E.M. Kruedewagen, J.J. Fourie, I.G. Horak, W. Davis, K.J. Krieger, Efficacy of an Imidacloprid/Flumethrin collar against fleas, ticks, mites and lice on dogs, *Parasit. Vectors.* 5 (2012) 102-118.
- [20] D. Satinsky, D. Kamenickova, P. Chocholous, P. Solich, Fast HPLC method for determination of Fenoxycarb and Permethrin in antiparasitic veterinary shampoo using fused-core column, *Chromatographia* 76 (2013) 1559-1564.
- [21] A. Di Pietra, V. Cavrini, V. Andrisano, R. Gatti, HPLC analysis of imidazole antimycotic drugs in pharmaceutical formulations, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 10 (1992) 873-879.
- [22] R. Musiol, W. Kowalczyk, Azole antimycotics-a highway to new drugs or a dead end?, *Curr. Med. Chem.* 19 (2012) 1378-1388.
- [23] R.A. Ramo, P.J. Van den Brink, C. Ruepert, L.E. Castillo, J.S. Gunnarsson, Environmental risk assessment of pesticides in the River Madre de Dios, Costa Rica using PERPEST, SSD, and msPAF models, *Environ. Sci. Pollut. Res.* (2016). doi: 10.1007/s11356-016-7375-9.

- [24] O. Ogbeide, I. Tongo, A. Enuneku, E. Ogbomida, L. Ezemonye, Human health risk associated with dietary and non-dietary intake of organochlorine pesticide residues from rice fields in Edo State Nigeria, *Expo. Heal.* 8 (2016) 53-66.
- [25] WHO, World Health Organization. The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification 2009.
- [26] J.A. Zarn, B.J. Brüsweiler, J.R. Schlatter, Azole fungicides affect mammalian steroidogenesis by inhibiting sterol 14 α -demethylase and aromatase, *Environ. Health Perspect.* 111 (2003) 255-261.
- [27] W. Zhang, Y. Ramamoorthy, T. Kilicarslan, H. Nolte, R.F. Tyndale, E.M. Sellers, Inhibition of cytochrome P450 by antifungal imidazole derivatives, *Drug Metab. Dispos.* 30 (2002) 314-318.
- [28] M.B. Kjærstad, C. Taxvig, C. Nellemann, A.M. Vinggaard, H.R. Andersen, Endocrine disrupting effects in vitro of conazole antifungals used as pesticides and pharmaceuticals, *Reprod. Toxicol.* 30 (2010) 573-582.
- [29] R. Poulsen, X. Luong, M. Hansen, B. Styrisshave, T. Hayes, Tebuconazole disrupts steroidogenesis in *Xenopus laevis*, *Aquat. Toxicol.* 168 (2015) 28-37.
- [30] E. Menegola, M.L. Brocchia, F. Di Renzo, V. Massa, E. Giavini, Study on the common teratogenic pathway elicited by the fungicides triazole-derivatives, *Toxicol. Vitro.* 19 (2005) 737-748.
- [31] E. Giavini, E. Menegola, Are azole fungicides a teratogenic risk for human conceptus?, *Toxicol. Lett.* 198 (2010) 106-111.
- [32] K. Crofton, A structure-activity relationship for the neurotoxicity fungicides, *Toxicol. Lett.* 84 (1996) 155-159.
- [33] A.K. Chopra, M.K. Sharma, S. Chamoli, Bioaccumulation of organochlorine pesticides in aquatic system-an overview, *Environ. Monit. Assess.* 173 (2011) 905-916.
- [34] S.H. Zahm, S.S. Devesa, Childhood cancer: Overview of incidence trends and environmental carcinogens, *Environ. Health Perspect.* 103 (1995) 177-184.
- [35] M. Iscan, T. Coban, I. Cok, D. Bulbul, B.C. Eke, S. Burgaz, The organochlorine pesticide residues and antioxidant enzyme activities in human breast tumors: is there any association?, *Breast Cancer Res. Treat.* 72 (2002) 173-182.
- [36] E.D. Louis, P. Factor-Litvak, M. Parides, L. Andrews, R.M. Santella, M.S. Wolff,

- Organochlorine pesticide exposure in essential tremor: A case-control study using biological and occupational exposure assessments, *Neurotoxicology* 27 (2006) 579-586.
- [37] N. Chhillar, N.K. Singh, B.D. Banerjee, K. Bala, M. Mustafa, D. Sharma, M. Chhillar, Organochlorine pesticide levels and risk of Parkinson's disease in North Indian population, *ISRN Neurol.* 2013 (2013) 1-6.
- [38] N. Chhillar, N.K. Singh, B. Banerjee, K. Bala, M. Basu, Beta hexachlorocyclohexane (β -HCH) and risk of Alzheimer's disease and Parkinson's disease, *Int. Proc. Chem. Biol. Environ. Eng.* 40 (2012) 28-33.
- [39] I. Yamamoto, G. Yabuta, M. Tomizawa, T. Saito, T. Miyamoto, S. Kagabu, Molecular mechanism for selective toxicity of nicotinoids and neonicotinoids, *J. Pestic. Sci.* 20 (1995) 33-40.
- [40] M. Shimomura, Molecular mechanism of selective toxicity of neonicotinoids, *J. Pestic. Sci.* 30 (2005) 230-231.
- [41] P.R. Whitehorn, S O'Connor, F. Wackers, D. Goulson, Neonicotinoid pesticide reduces bumble bee colony growth and queen production, *Science* 336 (2012) 351-352.
- [42] M. Henry, M. Béguin, F. Requier, O. Rollin, J.F. Odoux, P. Aupinel, J. Aptel, S. Tchamitchian, A. Decourtye, A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees, *Science* 336 (2012) 348-350.
- [43] B.A. Woodcock, N.J.B. Isaac, J.M. Bullock, D.B. Roy, D.G. Garthwaite, A. Crowe, R.F. Pywell, Impacts of neonicotinoid use on long-term population changes in wild bees in England, *Nat. Commun.* 7 (2016) 1-8.
- [44] M.G. Vijver, P.J. Van den Brink, Macro-invertebrate decline in surface water polluted with Imidacloprid: A rebuttal and some new analyses, *PLoS One* 9 (2014) 1-9.
- [45] C.A. Hallmann, R.P.B. Foppen, C.A.M. Van Turnhout, H. de Kroon, E. Jongejans, Declines in insectivorous birds are associated with high neonicotinoid concentrations, *Nature* 511 (2014) 341-343.
- [46] F. Sanchez-Bayo, K. Goka, Pesticide residues and bees - A risk assessment, *PLoS One* 9 (2014) 1-16.
- [47] Reglamento (CE) N° 1107/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo de 21 de

- octubre de 2009, relativa a la comercialización de productos fitosanitarios, Diario Oficial de la Unión Europea L 309/1.
- [48] Directiva 91/414/CEE del Consejo de 15 de julio de 1991 relativa a la comercialización de productos fitosanitarios, L 230/1.
- [49] Directiva 79/117/CEE del Consejo de 21 de diciembre de 1978 relativa a la prohibición de salida al mercado y de utilización de productos fitosanitarios que contengan determinadas sustancias activas, L 33/36.
- [50] Decreto del Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali. Prodotti fitosanitari: aggiornamento del decreto del Ministero della salute 27 agosto 2004 concernente i limiti massimi di residui delle sostanze attive nei prodotti destinati all'alimentazione.
- [51] Ordonnance du DFI sur les substances étrangères et les composants dans les denrées alimentaires (OSEC, RS 817.021.23) du 26 juin 1995 (Etat le 1er janvier 2009).
- [52] A. Angioni, F. Dedola, V.L. Garau, M. Schirra, P. Caboni, Fate of Iprovalicarb, Indoxacarb, and Boscalid residues in grapes and wine by GC-ITMS Analysis, *J. Agric. Food Chem.* 59 (2011) 6806-6812.
- [53] P. Cabras, E. Conte, Pesticide residues in grapes and wine in Italy, *Food Addit. Contam.* 18 (2001) 880-885.
- [54] M.J. Fernández, J. Oliva, A. Barba, M.A. Cámara, Fungicide dissipation curves in winemaking processes with and without maceration step, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 504-811.
- [55] M.J. Fernández, J. Oliva, A. Barba, M.A. Cámara, Effects of clarification and filtration processes on the removal of fungicide residues in red wines (Var. Monastrell), *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 6156-6161.
- [56] R.M. González-Rodríguez, B. Cancho-Grande, J. Simal-Gándara, Efficacy of new commercial formulations to control downy mildew and dissipation of their active fungicides in wine after good agricultural practices, *J. Sci. Food Agric.* 89 (2009) 2625-2635.
- [57] T. Pazzirota, L. Martin, M. Mezcuca, C. Ferrer, A.R. Fernández-Alba, Processing factor for a selected group of pesticides in a wine-making process: distribution of pesticides during grape processing, *Food Addit. Contam. Part A* 30 (2013) 1752-1760.

- [58] P. Cabras, A. Angioni, Pesticide residues in grapes, wine, and their processing products, *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 967-973.
- [59] P. Cabras, A. Angioni, V.L. Garau, M. Melis, F.M. Pirisi, E. V Minelli, F. Cabitza, M. Cubeddu, Fate of some new fungicides (Cyprodinil, Fludioxonil, Pyrimethanil, and Tebuconazole) from vine to wine, *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997) 2708-2710.
- [60] F. Cus, H.B. Cesnik, S.V. Bolta, A. Gregorcic, Pesticide residues in grapes and during vinification process, *Food Control* 21 (2010) 1512-1518.
- [61] S. Navarro, A. Barba, J. Oliva, G. Navarro, F. Pardo, Evolution of residual levels of six pesticides during elaboration of red wines. Effect of wine-making procedures in their disappearance, *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 264-270.
- [62] P. Cabras, V.L. Garau, F.M. Pirisi, M. Cubeddu, F. Cabitza, L. Spanedda, Fate of some insecticides from vine to wine, *J. Agric. Food Chem.* 43 (1995) 2613-2615.
- [63] I. Carpinteiro, M. Ramil, I. Rodríguez, R. Cela, Determination of fungicides in wine by mixed-mode solid phase extraction and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 7484-7492.
- [64] T. Guo, P. Fang, J. Jiang, F. Zhang, W. Yong, J. Liu, Y. Dong, Rapid screening and quantification of residual pesticides and illegal adulterants in red wine by direct analysis in real time mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1471 (2016) 27-33.
- [65] M. Pelajic, G. Pecek, D.M. Pavlovic, D.V. Cepo, Novel multiresidue method for determination of pesticides in red wine using gas chromatography-mass spectrometry and solid phase extraction, *Food Chem.* 200 (2016) 98-106.
- [66] A.R. Fontana, I. Rodríguez, M. Ramil, J.C. Altamirano, R. Cela, Solid-phase extraction followed by liquid chromatography quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry for the selective determination of fungicides in wine samples, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 2165-2175.
- [67] C. García-Jares, M. Celeiro, J.P. Lamas, M. Iglesias, M. Lores, M. Llopart, Rapid analysis of fungicides in white wines from Northwest Spain by ultrasound-assisted emulsification-microextraction and gas chromatography-mass spectrometry, *Anal. Methods* 6 (2014) 3108-3116.
- [68] J. Pereira dos Anjos, J.B. de Andrade, Simultaneous determination of pesticide multiresidues in white wine and rosé wine by SDME/GC-MS, *Microchem. J.* 120

- (2015) 69-76.
- [69] N. Arroyo-Manzanares, J.F. Huertas-Pérez, L. Gámiz-Gracia, A.M. García-Campaña, Control de micotoxinas en alimentos, *Boletín GRASEQA (Sociedad española de química analítica)* 7 (2014) 16-31.
- [70] FAO, Manual sobre la aplicación del sistema de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control (APPCC) en la prevención y control de las micotoxinas (2003).
- [71] B. Zimmerli, R. Dick, Ochratoxin A in table wine and grape-juice: Occurrence and risk assessment, *Food Addit. Contam.* 13 (1996) 655-668.
- [72] WHO, IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Ochratoxin A 56 (1993) 489-521.
- [73] A. Pfohl-leszkowicz, Ochratoxin A and aristolochic acid involvement in nephropathies and associated urothelial tract tumours, *Arh. Hig. Rada. Toksikol.* 60 (2009) 465-483.
- [74] M. Marin-Kuan, V. Ehrlich, T. Delatour, C. Cavin, B. Schilter, Evidence for a role of oxidative stress in the carcinogenicity of Ochratoxin A, *J. Toxicol.* 2011 (2011) 1-15.
- [75] B. Schilter, M. Marin-Kuan, T. Delatour, S. Nestler, P. Mantle, C. Cavin, Ochratoxin A: Potential epigenetic mechanisms of toxicity and carcinogenicity, *Food Addit. Contam.* 22 (2005) 88-93.
- [76] V. Ostry, F. Malir, J. Toman, Y. Grosse, Mycotoxins as human carcinogens-the IARC Monographs classification, *Mycotoxin Res.* 33 (2017) 65-73.
- [77] A.M. Domijan, M. Peraica, K. Markov, R. Fuchs, Urine Ochratoxin A and Sphinganine/Sphingosine ratio in residents of the endemic nephropathy area in Croatia, *Arch. Ind. Hyg. Toxicol.* 60 (2009) 387-393.
- [78] M. Castegnaro, D. Canadas, T. Vrabcheva, T. Petkova-Bocharova, I.N. Chernozemsky, A. Pfohl-Leszkowicz, Balkan endemic nephropathy: Role of Ochratoxins A through biomarkers, *Mol. Nutr. Food Res.* 50 (2006) 519-529.
- [79] S. Abid, W. Hassen, A. Achour, H. Skhiri, K. Maaroufi, F. Ellouz, E. Creppy, H. Bacha, Ochratoxin A and human chronic nephropathy in Tunisia: is the situation endemic?, *Hum. Exp. Toxicol.* 22 (2003) 77-84.
- [80] S. Paradells, B. Rocamonde, C. Llinares, V. Herranz-Pérez, M. Jimenez, J.M. García-Verdugo, I. Zipancic, J.M. Soria, M.A. García-Esparza, Neurotoxic effects of

- Ochratoxin A on the subventricular zone of adult mouse brain, *J. Appl. Toxicol.* 35 (2015) 737-751.
- [81] P.B. Wangikar, P. Dwivedi, N. Sinha, A.K. Sharma, A.G. Telang, Teratogenic effects in rabbits of simultaneous exposure to Ochratoxin A and aflatoxin B1 with special reference to microscopic effects, *Toxicology* 215 (2005) 37-47.
- [82] C.S.J. Woo, H. Partanen, P. Myllynen, K. Vahakangas, H. El-Nezami, Fate of the teratogenic and carcinogenic Ochratoxin A in human perfused placenta, *Toxicol. Lett.* 208 (2012) 92-99.
- [83] EFSA, European Food Safety Authority, Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the comission related to Ochratoxin A in food, *EFSA J.* 365 (2006) 1-56.
- [84] WHO, Safety evaluation of certain food additives and contaminants, *WHO Food Addit. Ser.* 59 (2008) 357-429.
- [85] REGLAMENTO (CE) Nº 1881/2006 de la comisión de 19 de diciembre de 2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios, *Diario Oficial de la Unión Europea L* 365.
- [86] AECOSAN, Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición, Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Ficha informativa sobre Ocratoxina A, 2015.
http://www.aecosan.mssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/gestion_riesgos/OTA_ficha_JUL15.pdf
- [87] N. Delage, A. d'Harlingue, B. Colonna Ceccaldi, G. Bompeix, Occurrence of mycotoxins in fruit juices and wine, *Food Control* 14 (2003) 225-227.
- [88] M.J. Hernández, M.V. García-Moreno, E. Durán, D. Guillén, C.G. Barroso, Validation of two analytical methods for the determination of Ochratoxin A by reversed-phased high-performance liquid chromatography coupled to fluorescence detection in musts and sweet wines from Andalusia, *Anal. Chim. Acta* 566 (2006) 117-121.
- [89] F.J. Espejo, S. Armada, Effect of activated carbon on Ochratoxin A reduction in "Pedro Ximenez" sweet wine made from off-vine dried grapes, *Eur. Food Res. Technol.* 229 (2009) 255-262.
- [90] M.P. Serratosa, A. Lopez-Toledano, C. Millan, M. Medina, J. Merida, Changes of

- Ochratoxin A in grapes inoculated with *Aspergillus carbonarius* and subjected to chamber-drying under controlled conditions, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 11907-11912.
- [91] M.J. Ruíz Bejarano, M.C. Rodríguez Dodero, C.G. Barroso, Optimizing the process of making sweet wines to minimize the content of Ochratoxin A, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 13006-13012.
- [92] Y. Sarigiannis, J. Kapolos, A. Koliadima, T. Tsegenidis, G. Karaiskakis, Ochratoxin A levels in Greek retail wines, *Food Control* 42 (2014) 139-143.
- [93] J. Cao, W. Kong, S. Zhou, L. Yin, L. Wan, M. Yang, Molecularly imprinted polymer-based solid phase clean-up for analysis of Ochratoxin A in beer, red wine, and grape juice, *J. Sep. Sci.* 36 (2013) 1291-1297.
- [94] P. Langcake, R.J. Pryce, The production of Resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury, *Physiol. Plant Pathol.* 9 (1976) 77-86.
- [95] J. Burns, T. Yokota, H. Ashihara, M.E.J. Lean, A. Crozier, Plant foods and herbal sources of Resveratrol, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 3337-3340.
- [96] R. Schubert, R. Fischer, R. Hain, P.H. Schreier, G. Bahnweg, D. Ernst, H. Sandermann, An ozone-responsive region of the grapevine Resveratrol synthase promoter differs from the basal pathogen-responsive sequence, *Plant Mol. Biol.* 34 (1997) 417-426.
- [97] B. Paul, I. Masih, J. Deopujari, C. Charpentier, Occurrence of Resveratrol and Pterostilbene in age-old darakchasava, an ayurvedic medicine from India, *J. Ethnopharmacol.* 68 (1999) 71-76.
- [98] M. Takaoka, Phenolic Substances of white Hellebore (*Veratrum Grandiflorum* Loes fil.), *J. Fac. Sci. Hokkaido Imp. Univ.* 3 (1940) 1-16.
- [99] G. Montsko, M.S.P. Nikfardjam, Z. Szabo, K. Boddi, T. Lorand, R. Ohmacht, L. Mark, Determination of products derived from trans-Resveratrol UV photoisomerisation by means of HPLC-APCI-MS, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 196 (2008) 44-50.
- [100] J. Constant, Reviews Alcohol, Ischemic heart disease, and the French Paradox, *Clin. Cardiol.* 20 (1997) 420-424.
- [101] B. Fauconneau, P. Waffo-Tegu, F. Huguet, L. Barrier, a Decendit, J.M. Merillon, Comparative study of radical scavenger and antioxidant properties of phenolic

- compounds from *Vitis vinifera* cell cultures using in vitro tests, *Life Sci.* 61 (1997) 2103-2110.
- [102] Q.Y. Choo, S.C.M. Yeo, P.C. Ho, Y. Tanaka, H.S. Lin, Pterostilbene surpassed Resveratrol for anti-inflammatory application: Potency consideration and pharmacokinetics perspective, *J. Funct. Foods* 11 (2014) 352-362.
- [103] A. Lançon, R. Frazzi, N. Latruffe, Anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-angiogenic properties of Resveratrol in ocular diseases, *Molecules* 21 (2016) 304-312.
- [104] N. Nagai, S. Kubota, K. Tsubota, Y. Ozawa, Resveratrol prevents the development of choroidal neovascularization by modulating AMP-activated protein kinase in macrophages and other cell types, *J. Nutr. Biochem.* 25 (2014) 1218-1225.
- [105] E.M. Varoni, A.F. Lo Faro, J. Sharifi-Rad, M. Iriti, Anticancer molecular mechanisms of Resveratrol, *Front. Nutr.* 3 (2016) 1-15.
- [106] R. Takasawa, H. Akahane, H. Tanaka, N. Shimada, T. Yamamoto, H. Uchida-Maruki, M. Sai, A. Yoshimori, S. Tanuma, Piceatannol, a natural trans-stilbene compound, inhibits human glyoxalase I, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 27 (2017) 1169-1174.
- [107] J. Wawszczyk, M. Kapral, A. Hollek, L. Weglarz, *In vitro* evaluation of antiproliferative and cytotoxic properties of pterostilbene against human color cancer cells, *Acta Pol. Pharm.* 71 (2014) 1051-1055.
- [108] A.F. Fernández, M.F. Fraga, The effects of the dietary polyphenol Resveratrol on human healthy aging and lifespan, *Epigenetics* 6 (2011) 870-874.
- [109] T. Sham, M. Li, C. Chan, H. Zhang, S. Chan, D.K. Mok, Cholesterol-lowering effects of piceatannol, a stilbene from wine, using untargeted metabolomics, *J. Funct. Foods* 28 (2017) 127-137.
- [110] F. Natella, A. Maccone, A. Ramberti, M. Forte, F. Mattivi, R.M. Matarese, C. Scaccini, Red wine prevents the postprandial increase in plasma cholesterol oxidation products: a pilot study, *Br. J. Nutr.* 105 (2011) 1718-1723.
- [111] K. Nagao, T. Jinnouchi, S. Kai, T. Yanagita, Pterostilbene, a dimethylated analog of Resveratrol, promotes energy metabolism in obese rats, *J. Nutr. Biochem.* 43 (2017) 151-155.
- [112] A. Lasa, M. Schweiger, P. Kotzbeck, I. Churruca, E. Simón, R. Zechner, M.P. Portillo, Resveratrol regulates lipolysis via adipose triglyceride lipase, *J. Nutr. Biochem.* 23

- (2012) 379-384.
- [113] J.C. Espín de Gea, Revidox Confidencial, AMAT Editorial, Barcelona, 2012.
- [114] D. Buonocore, A. Lazzaretti, P. Tocabens, V. Nobile, E. Cestone, G. Santin, M.G. Bottone, F. Marzatico, Resveratrol-Procyanidin blend: nutraceutical and antiaging efficacy evaluated in a placebo-controlled, double-blind study, *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.* 5 (2012) 159-165.
- [115] J. Tomé-Carneiro, M. González, M. Larrosa, M.J. Yáñez-Gascón, F.J. García-Almagro, J.A. Ruiz-Ros, M.T. García-Conesa, F.A. Tomás-Barberán, J.C. Espín, One-year consumption of a grape nutraceutical containing Resveratrol improves the inflammatory and fibrinolytic status of patients in primary prevention of cardiovascular disease, *Am. J. Cardiol.* 110 (2012) 356-363.
- [116] K. Farhadi, F. Esmailzadeh, M. Hatami, M. Forough, R. Molaie, Determination of phenolic compounds content and antioxidant activity in skin, pulp, seed, cane and leaf of five native grape cultivars in West Azerbaijan province, Iran, *Food Chem.* 199 (2016) 847-855.
- [117] B. Sun, A.M. Ribes, M.C. Leandro, A.P. Belchior, M.I. Spranger, Stilbenes: Quantitative extraction from grape skins, contribution of grape solids to wine and variation during wine maturation, *Anal. Chim. Acta* 563 (2006) 382-390.
- [118] J. Garrido, F. Borges, Wine and grape polyphenols-A chemical perspective, *Food Res. Int.* 54 (2013) 1844-1858.
- [119] E. Gómez-Plaza, R. Gil-Muñoz, J.M. López-Roca, A. Martínez, Color and phenolic compounds of a young red wine. Influence of wine-making techniques, storage temperature, and length of storage time, *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 736-741.
- [120] R.F. Pastor, M.R. Gargantini, M. Murgo, S. Prieto, H. Manzano, C. Aruani, C.I. Quini, M. Covas, R.H. Iermoli, Enrichment of Resveratrol in wine through a new vinification procedure, *J. Life Sci.* 9 (2015) 327-333.
- [121] P. Sun, J.L. Liang, L.Z. Kang, X.Y. Huang, J.J. Huang, Z.W. Ye, L.Q. Guo, J.F. Lin, Increased Resveratrol production in wines using engineered wine strains *Saccharomyces cerevisiae* EC1118 and relaxed antibiotic or auxotrophic selection, *Biotechnol. Prog.* 31 (2015) 650-655.
- [122] M.C. Careri, C.C. Corradini, L. Elviri, I. Nicoletti, I. Zagnoni, Liquid chromatography-

- electrospray tandem mass spectrometry of *cis*-Resveratrol and *trans*-Resveratrol: development, validation, and application of the method to red wine, grape, and winemaking byproducts, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 6868-6874.
- [123] R. Montes, M. García-López, I. Rodríguez, R. Cela, Mixed-mode solid-phase extraction followed by acetylation and gas chromatography mass spectrometry for the reliable determination of *trans*-Resveratrol in wine samples, *Anal. Chim. Acta* 673 (2010) 47-53.
- [124] J. Camara, J.S. Gonçalves, New method for determination of (*E*)-Resveratrol in wine based on microextraction using packed sorbent and ultra-performance liquid chromatography, *J. Sep. Sci.* 34 (2011) 2376-2384.
- [125] P. Viñas, N. Campillo, M. Hernández-Pérez, M. Hernández-Córdoba, A comparison of solid-phase microextraction and stir bar sorptive extraction coupled to liquid chromatography for the rapid analysis of Resveratrol isomers in wines, musts and fruit juices, *Anal. Chim. Acta* 611 (2008) 119-125.
- [126] F. Buiarelli, F. Coccioli, R. Jasionowska, M. Merolle, A. Terracciano, Analysis of some stilbenes in Italian wines by liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21 (2007) 2955-2964.
- [127] I. Liska, Fifty years of solid-phase extraction in water analysis-historical development and overview, *J. Chromatogr. A* 885 (2000) 3-16.
- [128] M.J.M. Wells, Principles of extraction and the extraction of semivolatile organics from liquids in sample preparation techniques in analytical chemistry 162, pp: 37-138 John Wiley & Sons, New York, 2003.
- [129] N.J.K. Simpson, Solid-Phase Extraction: Principles, Techniques, and Applications, Taylor & Francis, London, 2000.
- [130] D.A. Wells, Solid-phase extraction: High throughput techniques in Progress in Pharmaceutical and Biomedical Analysis 5, pp: 361-432, John Wiley & Sons, New York, 2003.
- [131] E.M. Thurman, S. Mills, Solid-Phase Extraction: Principles and Practice, John Wiley & Sons, New York, 1998.
- [132] D.F. Hagen, C.G. Markell, G.A. Schmitt, D.D. Blevins, Membrane approach to solid-phase extractions, *Anal. Chim. Acta* 236 (1990) 157-164.

- [133] R.E. Majors, New designs and formats in solid-phase extraction sample preparation, *LC-GC Eur.* 14 (2001) 2-6.
- [134] L.G. Blomberg, Two new techniques for sample preparation in bioanalysis: Microextraction in packed sorbent (MEPS) and use of a bonded monolith as sorbent for sample preparation in polypropylene tips for 96-well plates, *Anal. Bioanal. Chem.* 393 (2009) 797-807.
- [135] M. Abdel-Rehim, New trend in sample preparation: on-line microextraction in packed syringe for liquid and gas chromatography applications. I. Determination of local anaesthetics in human plasma samples using gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 801 (2004) 317-321.
- [136] C.F. Poole, New trends in solid-phase extraction, *Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 362-373.
- [137] M.C. Hennion, Graphitized carbons for solid-phase extraction, *J. Chromatogr. A* 885 (2000) 73-95.
- [138] N. Fontanals, R.M. Marcé, F. Borrull, Tendencias en sorbentes poliméricos para la extracción en fase sólida de compuestos polares, *Boletín de la SECYTA (Sociedad Española de Cromatografía y Técnicas Afines)* 31 (2010) 1-27.
- [139] V.F. Samanidou, K.I. Nikolaidou, I.N. Papadoyannis, Development and validation of an HPLC confirmatory method for the determination of tetracycline antibiotics residues in bovine muscle according to the European Union regulation 2002/657/EC, *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 2247-2258.
- [140] R.M. González-Rodríguez, B. Cancho-Grande, J. Simal-Gándara, Multiresidue determination of 11 new fungicides in grapes and wines by liquid-liquid extraction/clean-up and programmable temperature vaporization injection with analyte protectants/gas chromatography/ion trap mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 6033-6042.
- [141] N. Chen, H. Gao, N. Ye, Q. Zhong, Z. Xiong, X. Gu, Fast determination of 22 pesticides in rice wine by dispersive solid-phase extraction in combination with GC-MS, *Am. J. Analyt. Chem.* 3 (2012) 33-39.
- [142] D.T. Likas, N.G. Tsiropoulos, Residue screening in apple, grape and wine food samples for seven new pesticides using HPLC with UV detection. An application to

- Trifloxystrobin dissipation in grape and wine, *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* 89 (2009) 857-869.
- [143] E. Belajová, D. Rauová, Comparison of two clean up techniques in isolation of Ochratoxin A from red wine, *Czech J. Food Sci.* 28 (2010) 233-241.
- [144] M.J. Nozal, J.L. Bernal, J.J. Jiménez, M.T. Martín, J. Bernal, Determination of azolic fungicides in wine by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1076 (2005) 90-96.
- [145] A. Economou, H. Botitsi, S. Antoniou, D. Tsipi, Determination of multi-class pesticides in wines by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 5856-5867.
- [146] P. Pérez-Ortega, B. Gilbert-López, J.F. García-Reyes, N. Ramos-Martos, A. Molina-Díaz, Generic sample treatment method for simultaneous determination of multiclass pesticides and mycotoxins in wines by liquid chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1249 (2012) 32-40.
- [147] L. Lagunas-Allué, J. Sanz-Asensio, M.T. Martínez-Soria, Optimization and validation of a simple and fast method for the determination of fungicides in must and wine samples by SPE and GC/MS, *J. AOAC Int.* 95 (2012) 1511-1519.
- [148] M. Tamura, A. Takahashi, A. Uyama, N. Mochizuki, A method for multiple mycotoxin analysis in wines by solid phase extraction and multifunctional cartridge purification, and ultra-high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry, *Toxins* 4 (2012) 476-486.
- [149] F. Longobardi, V. Iacovelli, L. Catucci, G. Panzarini, M. Pascale, A. Visconti, A. Agostiano, Determination of Ochratoxin A in wine by means of immunoaffinity and aminopropyl solid-phase column cleanup and fluorometric detection, *J. Agric. Food Chem.* 61 (2013) 1604-1608.
- [150] V. Di Stefano, G. Avellone, R. Pitonzo, V.G. Capocchiano, A. Mazza, N. Cicero, G. Dugo, Natural co-occurrence of Ochratoxin A, Ochratoxin B and aflatoxins in Sicilian red wines, *Food Addit. Contam. A* 32 (2015) 1343-1351.
- [151] C. Giovannoli, C. Passini, F. Di Nardo, L. Anfossi, C. Baggiani, Determination of Ochratoxin A in Italian red wines by molecularly imprinted solid phase extraction and

- HPLC analysis, *J. Agric. Food Chem.* 62 (2014) 5220-5225.
- [152] C.L. Silva, J. Pereira, V.G. Wouter, C. Giró, J.S. Camara, A fast method using a new hydrophilic-lipophilic balanced sorbent in combination with ultra-high performance liquid chromatography for quantification of significant bioactive metabolites in wines, *Talanta* 86 (2011) 82-90.
- [153] K. Gamoh, K. Nakashima, Liquid chromatography/mass spectrometric determination of trans-Resveratrol in wine using a tandem solid-phase extraction method, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 13 (1999) 1112-1115.
- [154] M. Rezaee, Y. Assadi, M.R. Milani Hosseini, E. Aghaee, F. Ahmadi, S. Berijani, Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction, *J. Chromatogr. A* 1116 (2006) 1-9.
- [155] M.I. Leong, S.D. Huang, Dispersive liquid-liquid microextraction method based on solidification of floating organic drop for extraction of organochlorine pesticides in water samples, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 7645-7650.
- [156] J. Regueiro, M. Llompart, C. García-Jares, J.C. García-Montegudo, R. Cela, Ultrasound-assisted emulsification-microextraction of emergent contaminants and pesticides in environmental waters, *J. Chromatogr. A* 1190 (2008) 27-38.
- [157] E. Yiantzi, E. Psillakis, K. Tyrovolá, N. Kalogerakis, Vortex-assisted liquid-liquid microextraction of Octylphenol, Nonylphenol and Bisphenol-A, *Talanta* 80 (2010) 2057-2062.
- [158] Q. Wu, Q. Chang, C. Wu, H. Rao, X. Zeng, C. Wang, Z. Wang, Ultrasound-assisted surfactant-enhanced emulsification microextraction for the determination of carbamate pesticides in water samples by high performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 1773-1778.
- [159] C.K. Zacharis, P.D. Tzanavaras, K. Roubos, K. Dhima, Solvent-based de-emulsification dispersive liquid-liquid microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry for determination of trace organochlorine pesticides in environmental water samples, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 5896-5900.
- [160] Y.C. Fan, Z.L. Hu, M.L. Chen, C.S. Tu, Y. Zhu, Ionic liquid based dispersive liquid-liquid microextraction of aromatic amines in water samples, *Chinese Chem. Lett.* 19 (2008) 985-987.

- [161] M.A. Farajzadeh, M.R.A. Mogaddam, Air-assisted liquid-liquid microextraction method as a novel microextraction technique; application in extraction and preconcentration of phthalate esters in aqueous sample followed by gas chromatography-flame ionization detection, *Anal. Chim. Acta* 728 (2012) 31-38.
- [162] W.C. Tsai, S.D. Huang, Dispersive liquid-liquid microextraction with little solvent consumption combined with gas chromatography-mass spectrometry for the pretreatment of organochlorine pesticides in aqueous samples, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 5171-5175.
- [163] N. Campillo, P. Viñas, J.I. Cacho, R. Peñalver, M. Hernández-Córdoba, Evaluation of dispersive liquid-liquid microextraction for the simultaneous determination of chlorophenols and haloanisoles in wines and cork stoppers using gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 7323-7330.
- [164] U.K. Ahmad, W.H. Mechor, M. Mohamed, Dispersive liquid-liquid microextraction coupled to gas chromatography-electron capture detection for the analysis of trihalomethane formation potential, *Anal. Lett.* 45 (2012) 2198-2209.
- [165] L. Xu, F. Luan, H. Liu, Y. Gao, Dispersive liquid-liquid microextraction combined with non-aqueous capillary electrophoresis for the determination of Imazalil, Prochloraz and Thiabendazole in apples, cherry tomatoes and grape juice, *J. Sci. Food Agric.* 95 (2015) 745-751.
- [166] I. Carpinteiro, B. Abuín, I. Rodríguez, M. Ramil, R. Cela, Mixed-mode solid-phase extraction followed by dispersive liquid-liquid microextraction for the sensitive determination of ethylphenols in red wines, *J. Chromatogr. A* 1229 (2012) 79-85.
- [167] S.C. Cunha, A. Pena, J.O. Fernandes, Dispersive liquid-liquid microextraction followed by microwave-assisted silylation and gas chromatography-mass spectrometry analysis for simultaneous trace quantification of Bisphenol A and 13 ultraviolet filters in wastewaters, *J. Chromatogr. A* 1414 (2015) 10-21.
- [168] J.S. Chiang, S.D. Huang, Simultaneous derivatization and extraction of anilines in waste water with dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometric detection, *Talanta* 75 (2008) 70-75.
- [169] J. Casado, R. Nescatelli, I. Rodríguez, M. Ramil, F. Marini, R. Cela, Determination of benzotriazoles in water samples by concurrent derivatization-dispersive liquid-liquid

- microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1336 (2014) 1-9.
- [170] R. Montes, I. Rodríguez, M. Ramil, E. Rubí, R. Cela, Solid-phase extraction followed by dispersive liquid-liquid microextraction for the sensitive determination of selected fungicides in wine, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 5459-5466.
- [171] W. Ahmad, A.A. Al-Sibaai, A.S. Bashammakh, H. Alwael, M.S. El-Shahawi, Recent advances in dispersive liquid-liquid microextraction for pesticide analysis, *Trends Anal. Chem.* 72 (2015) 181-192.
- [172] T. Rodríguez-Cabo, I. Rodríguez, R. Cela, Determination of hydroxylated stilbenes in wine by dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1258 (2012) 21-29.
- [173] B. Chen, F. Wu, W. Wu, B. Jin, L. Xie, W. Feng, G. Ouyang, Determination of 27 pesticides in wine by dispersive liquid-liquid microextraction and gas chromatography-mass spectrometry, *Microchem. J.* 126 (2016) 415-422.
- [174] X. You, S. Wang, F. Liu, K. Shi, Ultrasound-assisted surfactant-enhanced emulsification microextraction based on the solidification of a floating organic droplet used for the simultaneous determination of six fungicide residues in juices and red wine, *J. Chromatogr. A* 1300 (2013) 64-69.
- [175] T. Rodríguez-Cabo, M. Ramil, I. Rodríguez, R. Cela, Dispersive liquid-liquid microextraction with non-halogenated extractants for trihalomethanes determination in tap and swimming pool water, *Talanta* 99 (2012) 846-852.
- [176] M. Moniruzzaman, I. Rodríguez, T. Rodríguez-Cabo, R. Cela, S.A. Sulaiman, S.H. Gan, Assessment of dispersive liquid-liquid microextraction conditions for gas chromatography time-of-flight mass spectrometry identification of organic compounds in honey, *J. Chromatogr. A* 1368 (2014) 26-36.
- [177] M. Ghambarian, F. Tajabadi, Y. Yaminib, A. Esrafil, Dispersive liquid-liquid microextraction with back extraction using an immiscible organic solvent for determination of benzodiazepines in water, urine, and plasma samples, *RSC Adv.* 6 (2016) 114198-114207.
- [178] M. Saraji, M.K. Boroujeni, Recent developments in dispersive liquid-liquid microextraction microextraction techniques, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 2027-

- 2066.
- [179] N. Fattahi, S. Samadi, Y. Assadi, M.R.M. Hosseini, Solid-phase extraction combined with dispersive liquid-liquid microextraction-ultra preconcentration of chlorophenols in aqueous samples, *J. Chromatogr. A* 1169 (2007) 63-69.
- [180] S.M. Sorouraddin, M.R.A. Mogaddam, Development of molecularly imprinted-solid phase extraction combined with dispersive liquid-liquid microextraction for selective extraction and preconcentration of triazine herbicides from aqueous samples, *J. Iran. Chem. Soc.* 13 (2016) 1093-1104.
- [181] J. Chen, G. Zhou, Y. Deng, H. Cheng, J. Shen, Y. Gao, G. Peng, Ultrapreconcentration and determination of organophosphorus pesticides in water by solid-phase extraction combined with dispersive liquid-liquid microextraction and high-performance liquid chromatography, *J. Sep. Sci.* 39 (2016) 272-278.
- [182] R.P. Belardi, J.B. Pawliszyn, The application of chemically modified fused silica fibers in the extraction of organics from water matrix samples and their rapid transfer to capillary columns, *Water Pollut. Res. J. Can.* 24 (1989) 179-191.
- [183] S.A.S. Wercinski, J. Pawliszyn, Solid phase microextraction theory, in: S.A.S. Wercinski (Ed.), *Solid Phase Microextraction a Pract. Guid.*, Marcel Dekker, Inc., New York, 1999: pp. 1-29.
- [184] A. Kabir, K.G. Furton, Fabric phase sorptive extractors (FPSE), US 20140274660, 2014.
- [185] A. Kabir, R. Mesa, J. Jurmain, K.G. Furton, Fabric phase sorptive extraction explained, *Separations* 4 (2017) 1-29.
- [186] M. van Pinxteren, A. Paschke, P. Popp, Silicone rod and silicone tube sorptive extraction, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2589-2598.
- [187] S.G. O'Connell, L.D. Kincl, K.A. Anderson, Silicone wristbands as personal passive samplers, *Environ. Sci. Technol.* 48 (2014) 3327-3335.
- [188] S.C. Hammel, K. Hoffman, T.F. Webster, K.A. Anderson, H.M. Stapleton, Measuring personal exposure to organophosphate flame retardants using silicone wristbands and hand wipes, *Environ. Sci. Technol.* 50 (2016) 4483-4491.
- [189] D. Gilbert, P. Mayer, M. Pedersen, A. Marie, Endocrine activity of persistent organic pollutants accumulated in human silicone implants - Dosing *in vitro* assays by

- partitioning from silicone, *Environ. Int.* 84 (2015) 107-114.
- [190] L. Vergauwen, S.N. Schmidt, E. Stinckens, W. Maho, R. Blust, P. Mayer, A. Covaci, D. Knapen, A high throughput passive dosing format for the fish embryo acute toxicity test, *Chemosphere* 139 (2015) 9-17.
- [191] K.E.C. Smith, G.J. Oostingh, P. Mayer, Passive Dosing for producing defined and constant exposure of hydrophobic organic compounds during *in vitro* toxicity tests, *Chem. Res. Toxicol.* 23 (2010) 55-65.
- [192] M. Lores, M. Llompart, R. González-García, C. González-Barreiro, R. Cela, On-fibre photodegradation studies of polychlorinated biphenyls using SPME-GC-MS-MS: a new approach, *Chemosphere* 47 (2002) 607-615.
- [193] M. Fernández-Álvarez, L. Sánchez-Prado, M. Lores, M. Llompart, C. García-Jares, R. Cela, Alternative sample preparation method for photochemical studies based on solid phase microextraction: synthetic pyrethroid photochemistry, *J. Chromatogr. A* 1152 (2007) 156-167.
- [194] M. Fernández-Álvarez, M. Llompart, C. García-Jares, T. Dagnac, M. Lores, Investigation of the photochemical behaviour of pyrethroids lacking the cyclopropane ring by photo-solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 23 (2009) 3673-3687.
- [195] T. Rodríguez-Cabo, I. Rodríguez, M. Ramil, R. Cela, Assessment of silicone as support to investigate the transformation routes of organic chemicals under environmental conditions and UV exposure. Application to selected fungicides, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 4187-4198.
- [196] J.T. Watson, O.D. Sparkman, *Introduction to mass spectrometry: instrumentation, applications and strategies for data interpretation*, 4^a Ed., John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, 2007.
- [197] E. de Hoffmann, V. Stoobant, *Mass spectrometry. Principles and applications*, 3^a Ed., John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, 2007.
- [198] R.G. Cooks, R.E. Kaiser, *Quadrupole ion trap mass spectrometry*, *Acc. Chem. Res.* 23 (1990) 213-219.
- [199] Y. Picó, *Advanced mass spectrometry, Part I: Advanced mass spectrometry*

- approaches and platforms, Elsevier, 2015.
- [200] E.E. Stashenko, J.R. Martínez, GC-MS: Más de un analizador de masas, ¿para qué?, *Sci. Chromatogr.* 2 (2010) 25-48.
- [201] I.V. Chernushevich, A. V. Loboda, B.A. Thomson, An introduction to quadrupole-time-of-flight mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.* 36 (2001) 849-865.
- [202] R. Cela, R.A. Lorenzo, M.C. Casais, *Técnicas de separación en Química Analítica*, Editorial Síntesis, Madrid, 2002.
- [203] D.A. Skoog, F.J. Holler, S.R. Crouch, *Principios de análisis instrumental*, 6ª Ed., Brooks/Cole, Belmont, CA, 2007.
- [204] M. García-López, I. Rodríguez, R. Cela, K.K. Kroening, J.A. Caruso, Determination of organophosphate flame retardants and plasticizers in sediment samples using microwave-assisted extraction and gas chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry, *Talanta* 79 (2009) 824-829.
- [205] E. Hoh, K. Mastovska, Large volume injection techniques in capillary gas chromatography, *J. Chromatogr. A* 1186 (2008) 2-15.
- [206] J.L. Tadeo (Ed.) *Analysis of Pesticides in Food and Environmental Samples*, CRC Press. Taylor & Francis Group, Florida, 2008.
- [207] M. Celeiro, M. Llompart, J.P. Lamas, M. Lores, C. García-Jares, T. Dagnac, Determination of fungicides in white grape bagasse by pressurized liquid extraction and gas chromatography tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1343 (2014) 18-25.
- [208] F. Zhang, C. Yu, W. Wang, R. Fan, Z. Zhang, Y. Guo, Rapid simultaneous screening and identification of multiple pesticide residues in vegetables, *Anal. Chim. Acta* 757 (2012) 39-47.
- [209] P. Viñas, N. Campillo, N. Martínez-Castillo, M. Hernández-Córdoba, Solid-phase microextraction on-fiber derivatization for the analysis of some polyphenols in wine and grapes using gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 1279-1284.
- [210] V.G. Amelin, N.M. Karaseva, A. V. Tretyakov, Simultaneous determination of trichothecene micotoxins, Ochratoxin A, and Zearalenone in grain and products of its processing, feed premixes, and meat by gas chromatography, *J. Anal. Chem.* 68

- (2013) 61-67.
- [211] C. Juan, H. Berrada, J. Mañes, S. Oueslati, Multi-mycotoxin determination in barley and derived products from Tunisia and estimation of their dietary intake, *Food Chem. Toxicol.* 103 (2017) 148-156.
- [212] L. Cai, J.A. Koziel, M. Dharmadhikari, J. (Hans) van Leeuwen, Rapid determination of *trans*-Resveratrol in red wine by solid-phase microextraction with on-fiber derivatization and multidimensional gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 281-287.
- [213] J.I. Cacho, N. Campillo, P. Viñas, M. Hernández-Córdoba, Stir bar sorptive extraction with gas chromatography-mass spectrometry for the determination of Resveratrol, Piceatannol and oxyresveratrol isomers in wines, *J. Chromatogr. A* 1315 (2013) 21-27.
- [214] R. Flamini, A.D. Vedova, Fast determination of the total free Resveratrol content in wine by direct-exposure-probe, positive-ion chemical ionization and collision-induced-dissociation mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18 (2004) 1925-1931.
- [215] J. Kalyan, S.S. Pekamwar, Ultra performance liquid chromatography: a recent development in HPLC, *Int. J. Pharm. Technol.* 4 (2012) 1800-1821.
- [216] W. Saavedra-Charca, V. Vásquez-Villalobos, C. Rojas-Padilla, Analytical techniques used in food metabolomics, *Agroind. Sci.* 5 (2015) 191-210.
- [217] Z. He, Y. Xu, L. Wang, Y. Peng, M. Luo, H. Cheng, X. Liu, Wide-scope screening and quantification of 50 pesticides in wine by liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry combined with liquid chromatography/quadrupole linear ion trap mass spectrometry, *Food Chem.* 196 (2015) 1248-1255.
- [218] I.R. Pizzutti, A. de Kok, J. Scholten, L.W. Righi, C.D. Cardoso, G.N. Rohers, R.C. da Silva, Development, optimization and validation of a multimethod for the determination of 36 mycotoxins in wines by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Talanta* 129 (2014) 352-363.
- [219] A. Bacaloni, C. Cavalieri, A. Faberi, E. Pastorini, R. Samperi, A. Laganà, Automated on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry method for the determination of Ochratoxin A in wine and beer, *J.*

- Agric. Food Chem. 53 (2005) 5518-5525.
- [220] M.A. Presta, B. Bruyneel, R. Zanella, J. Kool, J.G. Krabbe, H. Lingeman, Determination of flavonoids and Resveratrol in wine by turbulent-flow chromatography-LC-MS, *Chromatographia* 69 (2009) S167-S173.
- [221] S.N.N.S. Hashim, L.J. Schwarz, R.I. Boysen, Y. Yang, B. Danylec, M.T.W. Hearn, Rapid solid-phase extraction and analysis of Resveratrol and other polyphenols in red wine, *J. Chromatogr. A* 1313 (2013) 284-290.
- [222] F. Hernández, M. Ibáñez, R. Bade, L. Bijlsma, J. V Sancho, Investigation of pharmaceuticals and illicit drugs in waters by liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry, *Trends Anal. Chem.* 63 (2014) 140-157.
- [223] F. Hernández, T. Portolés, E. Pitarch, F.J. López, Gas chromatography coupled to high-resolution time-of-flight mass spectrometry to analyze trace-level organic compounds in the environment, food safety and toxicology, *Trends Anal. Chem.* 30 (2011) 388-400.
- [224] J.H. Jiwan, P. Wallemacq, M. Hérent, HPLC-high resolution mass spectrometry in clinical laboratory?, *Clin. Biochem.* 44 (2011) 136-147.
- [225] M. Krauss, H. Singer, J. Hollender, LC-high resolution MS in environmental analysis: from target screening to the identification of unknowns, *Anal. Bioanal. Chem.* 397 (2010) 943-951.
- [226] F. Hernández, J. V Sancho, M. Ibáñez, E. Abad, T. Portolés, L. Mattioli, Current use of high-resolution mass spectrometry in the environmental sciences, *Anal. Bioanal. Chem.* 403 (2012) 1251-1264.
- [227] A. Kaufmann, P. Butcher, K. Maden, S. Walker, M. Widmer, Comprehensive comparison of liquid chromatography selectivity as provided by two types of liquid chromatography detectors (high resolution mass spectrometry and tandem mass spectrometry): "Where is the crossover point?," *Anal. Chim. Acta* 673 (2010) 60-72.
- [228] T. Rodríguez-Cabo, M. Paganini, I. Carpinteiro, L. Fontenla, I. Rodríguez, M.C. Pietrogrande, R. Cela, Liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry evaluation of fungicides reactivity in free chlorine containing water samples, *J. Mass Spectrom.* 48 (2013) 216-226.



III. DESARROLLO DE METODOLOGÍA ANALÍTICA



En la primera parte de esta memoria de Tesis, se han desarrollado varios métodos analíticos para llevar a cabo la determinación de compuestos de origen natural (estilbenos y Ocratoxina A) y contaminantes sintéticos (pesticidas) en muestras de vino. Como se ha indicado anteriormente, se han utilizado tanto técnicas de extracción exhaustivas como la extracción en fase sólida (SPE), como no exhaustivas como es el caso de la microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME), con el fin de minimizar los grandes volúmenes de disolventes empleados con otras técnicas como la extracción líquido-líquido (LLE).

SPE y DLLME presentan entre sus ventajas, la posibilidad de combinarse entre sí, ofreciendo además de una mejor selectividad en la etapa de extracción de los analitos, mayores factores de concentración. Por ello, se ha desarrollado una metodología analítica para el análisis conjunto de los compuestos citados anteriormente y otros presentes habitualmente en vino como los vinil y etilfenoles. Estos últimos son generados por levaduras en el proceso de elaboración del vino blanco y tinto, respectivamente, afectando de manera positiva o negativa a las propiedades organolépticas de éste. También se han incluido otros compuestos de origen antropogénico como los alquilfenoles y el Bisfenol A, como especies potencialmente resultantes de la contaminación del vino durante la elaboración y/o envasado.

A continuación, se esquematizan los métodos analíticos desarrollados en esta sección de la Tesis en función de la técnica de extracción empleada, además de incluirse las publicaciones científicas generadas.





**III.A. MICROEXTRACCIÓN
LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA
(DLLME)**



La microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME) emplea un sistema ternario de disolventes formado por una fase acuosa y dos disolventes orgánicos: un agente extractante, con el que se quiere concentrar los compuestos presentes en la muestra, y un agente dispersante, que facilita la transferencia de los analitos desde la fase acuosa al extractante. Entre las ventajas que presenta esta técnica, destacan su bajo coste, ya que se requieren pequeños volúmenes de disolventes, y su simplicidad operacional con cortos tiempos de extracción. Aunque se trate de una técnica de extracción no exhaustiva, los porcentajes de recuperación suelen ser relativamente altos.

Los factores que afectan a la eficacia de extracción, indicados en la sección II.B, son los siguientes: el tipo de agentes dispersante y extractante, el volumen de éstos, el tiempo de extracción y centrifugación, la fuerza iónica, el pH de la muestra y la adición de agentes derivatizantes. Con el objeto de mejorar la eficacia del proceso de extracción de los analitos, estos factores han sido optimizados para cada uno de los métodos generados.

A continuación, se resumen las aplicaciones de DLLME desarrolladas en este proyecto de Tesis para la determinación de pesticidas y estilbenos en vino.

1. PESTICIDAS: FUNGICIDAS

Los fungicidas son productos fitosanitarios que se aplican en el viñedo para impedir el crecimiento de hongos, evitando así una disminución en la producción y en la calidad de la uva. Debido a que la mayor parte de la uva cultivada se dedica a la producción de vino, es frecuente la transferencia de fungicidas, así como otros pesticidas, al vino. Con el fin de evaluar los niveles de estos compuestos en vino, se ha desarrollado una metodología analítica basada en el uso de la microextracción líquido-líquido dispersiva con solidificación de gota flotante (DLLME-SFO). Esta modalidad de DLLME usa disolventes con puntos de fusión comprendidos entre 0 °C y temperatura ambiente como agentes extractantes, permitiendo la solidificación de la fase orgánica por enfriamiento de la muestra en un baño de hielo. Posteriormente, se realizó la determinación de los compuestos por cromatografía

de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) utilizando un analizador cuadrupolar (Q).

En la Figura III.A.1 se muestra un esquema del proceso analítico desarrollado para la determinación de fungicidas en vino, empleado en la Publicación III.A.1.

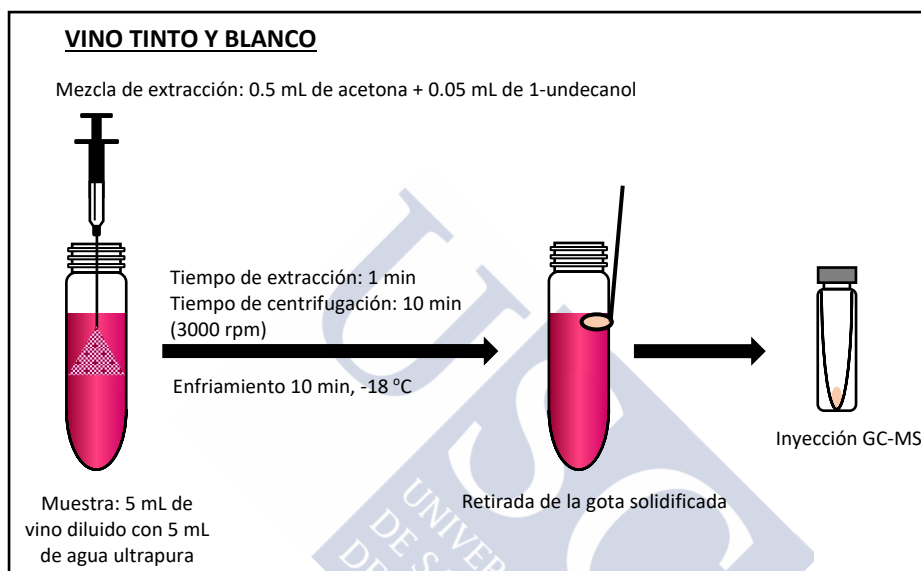


Figura III.A.1: Esquema del proceso de extracción para la determinación de fungicidas en vino mediante DLLME y GC-MS.

2. ESTILBENOS

Los estilbenos son compuestos generados de manera natural por las plantas en respuesta a situaciones de estrés creadas, entre otras variables, por infecciones debidas a insectos, bacterias u hongos. Los niveles de estos compuestos en la vid vienen determinados por factores ambientales como el clima de la zona de cultivo o la variedad de planta cultivada. En el proceso de vinificación, dependiendo de la técnica empleada, estos compuestos se transfieren al vino. En esta Tesis se han estudiado los niveles en los que se encuentran estos compuestos empleando como técnica de extracción DLLME combinada con cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).

Teniendo en cuenta la estructura química de los analitos, es necesaria una etapa de derivatización para abordar su separación mediante GC. En este trabajo, tal como se muestra en la Figura III.A.2, se ha añadido una etapa de derivatización antes del proceso de extracción. En la Publicación III.A.2 se desarrolla el procedimiento seguido, indicándose la comparativa de los resultados obtenidos al realizar la derivatización con un agente sililante, *N,O*-Bis-(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) y la acilación con anhídrido acético (acetilación) en medio básico.

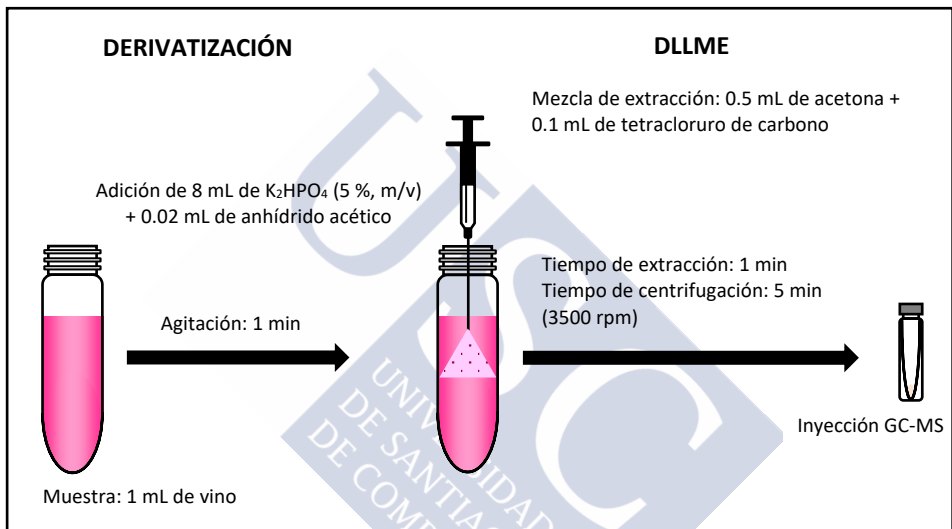


Figura III.A.2: Esquema del proceso de preparación de muestra para la determinación de estilbenos en vino mediante DLLME y GC-MS.



PUBLICACIÓN III.A.1

**DISPERSIVE LIQUID-LIQUID MICROEXTRACTION USING NON-
CHLORINATED, LIGHTER THAN WATER SOLVENTS FOR GAS
CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY DETERMINATION OF
FUNGICIDES IN WINE**

T. Rodríguez-Cabo, I. Rodríguez, M. Ramil, R. Cela

Journal of Chromatography A 1218 (2011) 6603-6611

doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2011.07.054>



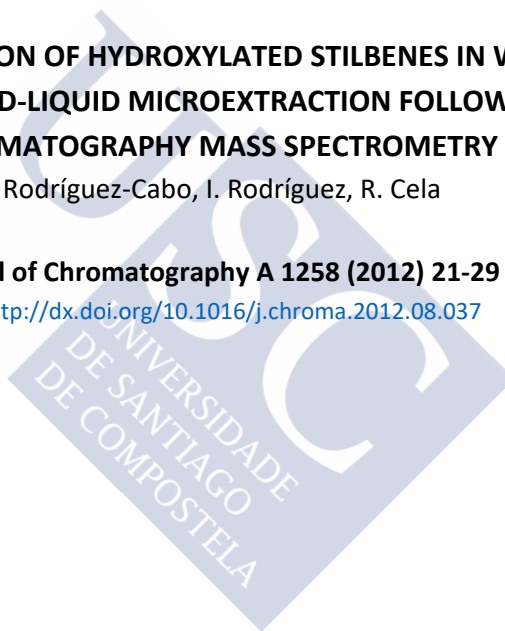
PUBLICACIÓN III.A.2

**DETERMINATION OF HYDROXYLATED STILBENES IN WINE BY
DISPERSIVE LIQUID-LIQUID MICROEXTRACTION FOLLOWED BY GAS
CHROMATOGRAPHY MASS SPECTROMETRY**

T. Rodríguez-Cabo, I. Rodríguez, R. Cela

Journal of Chromatography A 1258 (2012) 21-29

doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2012.08.037>







III.B. EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPE)



La extracción en fase sólida (SPE) se ha aplicado en esta Tesis a la determinación de pesticidas, estilbenos y Ocratoxina A en muestras de vino. Además, se ha descrito una aplicación utilizando SPE para la extracción de las muestras antes de la concentración de los analitos mediante DLLME. De este modo, se eliminan las interferencias de la muestra, mejorando la selectividad del proceso y favoreciendo la separación entre las fases acuosa y extractante durante DLLME.

A continuación, se introducen los trabajos desarrollados empleando SPE como técnica de preparación de muestra, atendiendo a la naturaleza de los analitos extraídos, y las publicaciones científicas obtenidas de estos trabajos.

1. PESTICIDAS: NEONICOTINOIDES

Los neonicotinoides son insecticidas que actúan sobre el sistema nervioso central de los insectos, por lo que se considera que presentan una baja neurotoxicidad en mamíferos. Fueron introducidos en el mercado en los años 90 como una alternativa a las sustancias utilizadas anteriormente, consideradas más dañinas. Sin embargo, en la actualidad se conoce que estos compuestos pueden afectar a las poblaciones de organismos no objetivo, como es el caso de las abejas.

En la industria vitivinícola, aunque los pesticidas más utilizados son los fungicidas, cada vez es más frecuente el uso de insecticidas para evitar la acción de insectos tales como la polilla de la vid o el pulgón. Por esta razón, se ha desarrollado un método para conocer los niveles de esos compuestos en vino ya que, como se ha indicado anteriormente, dependiendo de variables ambientales y/o de la técnica de vinificación, los neonicotinoides pueden ser transferidos al vino.

En la Figura III.B.1, se muestra el esquema de los procedimientos seguidos para la extracción de los analitos. Se ha desarrollado un método para vino tinto y blanco en el que es necesario la adición de una etapa de limpieza, con un cartucho de Florisil, para disminuir los efectos de matriz en LC-MS. Además, con el fin de simplificar el proceso, en el caso de vino blanco se ha desarrollado un protocolo directo en el que no es necesaria esta etapa de

limpieza, y en el que se han disminuido factores como el volumen de la muestra empleada, la masa de adsorbente utilizado y volumen de disolvente de elución. La Publicación III.B.1 muestra el trabajo realizado en relación con la determinación de neonicotinoides en vino.

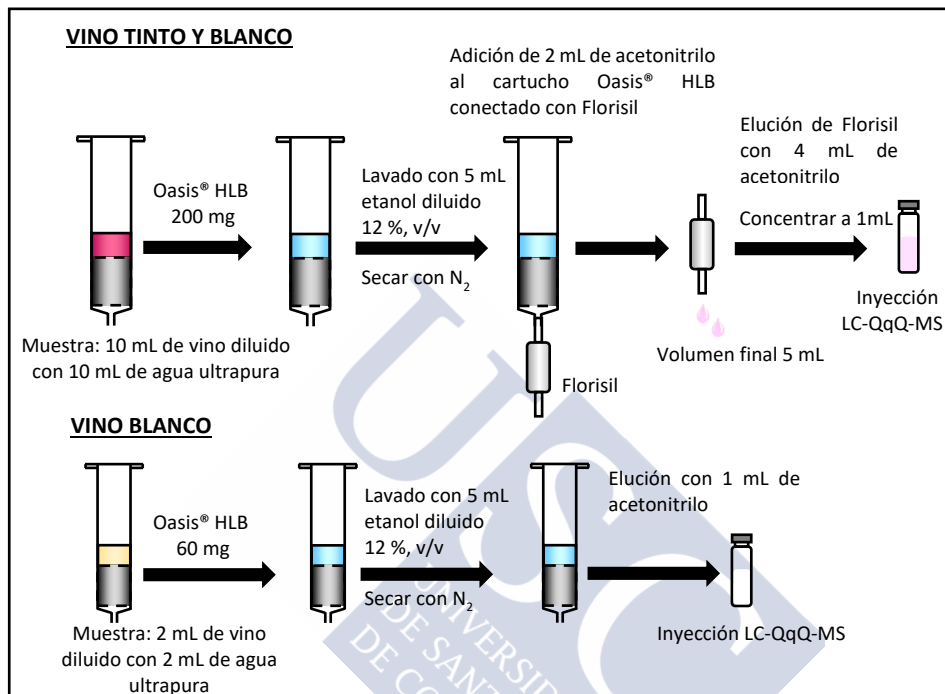


Figura III.B.1: Esquema de los procedimientos seguidos para la determinación de neonicotinoides en vino mediante SPE y LC-MS/MS.

2. OCRATOXINA A

La Ocratoxina A es una micotoxina producida como metabolito secundario por los hongos *Aspergillus* y *Penicillium*. Estos son capaces de crecer en las plantas en condiciones ambientales favorables, generalmente, elevada temperatura y en presencia de agua, causando su deterioro y, por tanto, el de sus frutos. Se trata de un compuesto con efectos nefrotóxicos y teratogénicos, además de ser considerado por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (*International Agency for Research on Cancer, IARC*) como “Posible carcinógeno para el ser humano”.

Debido a causas como la estabilidad de la Ocratoxina A, las condiciones climáticas existentes en ciertas regiones vinícolas y el tipo de elaboración, es relativamente frecuente la presencia de esta micotoxina en vino. Se detectan mayores concentraciones en los vinos dulces, debido a su elaboración a partir de uva pasa con alto contenido en azúcar, lo que estimula la actividad de estos hongos y como resultado, la formación de OTA. Para controlar la exposición a OTA en consumidores de vino, se estableció su nivel máximo en $2 \mu\text{g L}^{-1}$ para vinos con un contenido de etanol máximo del 15 %, por lo que no se han incluido en esta legislación los vinos dulces puesto que poseen una graduación superior.

La técnica más extendida para la extracción de OTA consiste en el uso de extracción en fase sólida (SPE) utilizando columnas de inmunoafinidad. Debido a su alto coste, en esta Tesis se ha desarrollado un método analítico alternativo para evaluar el contenido de este compuesto en vino tinto, blanco y dulce utilizando adsorbentes poliméricos de fase reversa y modo mixto, con posterior análisis por LC-MS con un analizador tipo QTOF. Este tipo de analizador nos ha ofrecido también la posibilidad de poder identificar la Ocratoxina C (OTC) en vino, un compuesto que resulta de la esterificación de la OTA en presencia de etanol. En la Figura III.B.2 se indica el esquema del proceso que se ha llevado a cabo en la etapa de extracción y en la Publicación III.B.2, la publicación resultante del estudio.

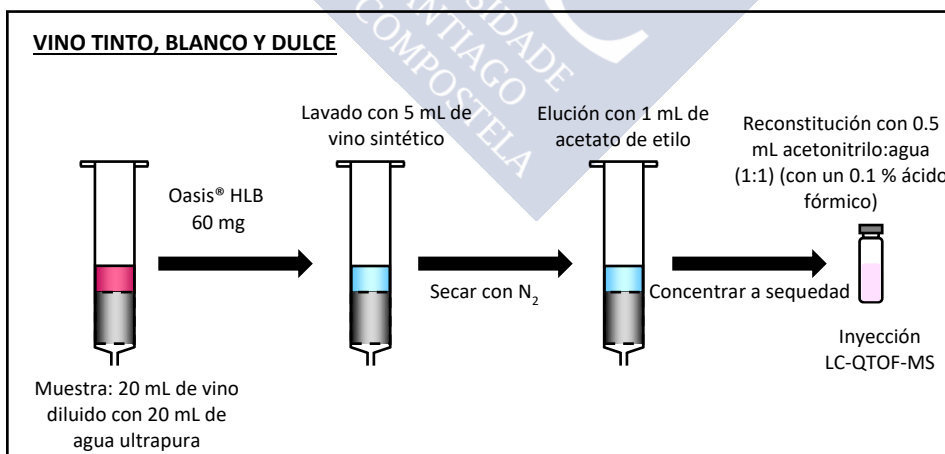


Figura III.B.2: Esquema de preparación de muestra seguido para la determinación de OTA en vino mediante SPE y LC-QTOF-MS.

3. ESTILBENOS

Como se ha indicado con anterioridad, los estilbenos son compuestos generados por las plantas ante situaciones de estrés como puede ser el ataque de hongos o insectos. Estos compuestos pueden transferirse de la uva al vino durante el proceso de vinificación, siendo ingeridos posteriormente por el ser humano. La ingesta de estos compuestos se ha relacionado con efectos beneficiosos en la salud de los consumidores debido a su carácter antioxidante y anti-inflamatorio, disminuyendo el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares.

En un primer momento, estas propiedades se relacionaron sólo con la presencia de Resveratrol en su forma *trans* (*t*-RESV). En la actualidad, estudios *in vivo* e *in vitro* realizados con otros compuestos estilbenoides, han revelado que algunos de estos efectos corresponden también a la presencia de otros antioxidantes como Piceatanol (PICEA) o Pterostilbeno (PTERO), incluyendo a alguno de sus derivados como es el caso de las formas glicosiladas, reducidas (dihidro) u oxidadas (dehidro) o a isómeros *cis/trans*.

En esta Tesis se ha desarrollado metodología analítica para cuantificar de forma conjunta los niveles de los estilbenos: PICEA, PTERO, *c*-RESV, *t*-RESV y la forma glicosilada de este último, PICE en vino. Se ha empleado SPE para la extracción de estos compuestos en vino tinto y blanco, usando como adsorbentes los materiales Oasis® MAX y Oasis® HLB, respectivamente, con el fin de minimizar los efectos de matriz durante la etapa de medida mediante LC-QTOF-MS.

La Figura III.B.3 muestra el esquema del proceso de extracción de estos compuestos. En la Publicación III.B.3 se presentan los resultados obtenidos en relación a la determinación de estos compuestos y la identificación de nuevos derivados de los estilbenos en vinos comerciales.

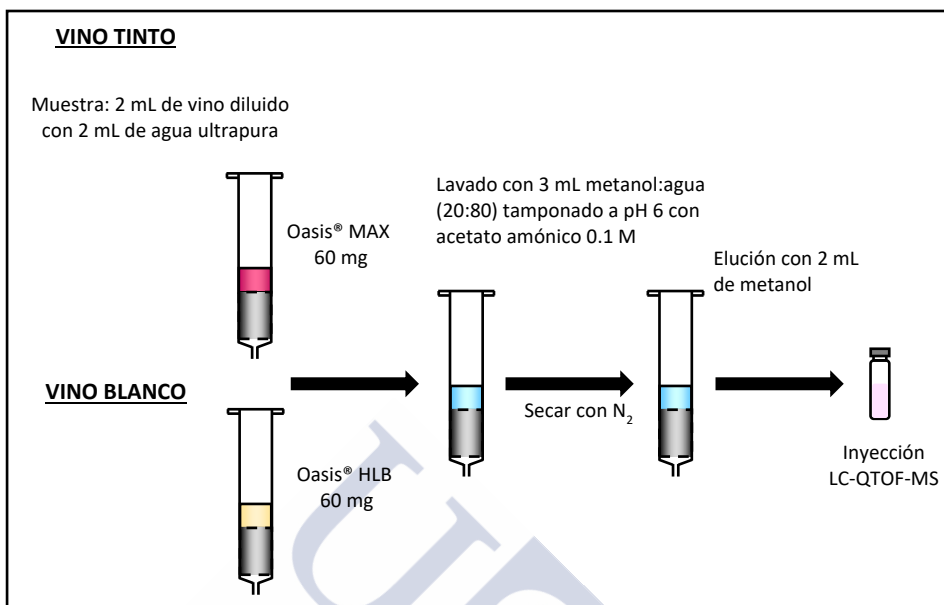


Figura III.B.3: Esquema seguido para la determinación de estilbenos en vino mediante SPE y LC-QTOF-MS.

4. DETERMINACIÓN MULTIANÁLITO DE COMPUESTOS SEMIVOLÁTILES EN

VINO

En esta sección se presenta la metodología analítica basada en el uso de GC combinada con espectrometría de masas exacta para la determinación de compuestos semivolátiles que pueden estar presentes en vino, afectando a la calidad de éste. Estos compuestos se han agrupado en cuatro clases: los pesticidas, entre los que se encuentran fungicidas, insecticidas y un herbicida; los estilbenos, productos naturales generados por la vid ante el ataque de hongos o insectos; los etil y vinil fenoles, responsables de ciertas características organolépticas del vino; y los alquilfenoles y Bisfenol A, posibles contaminantes introducidos al vino durante las etapas de elaboración y/o envasado.

Para determinar de forma simultánea los niveles de estos compuestos en vino, se ha optimizado un método de preparación de muestra combinando la extracción mediante SPE con la concentración de los analitos mediante DLLME. El análisis de los extractos obtenidos se realizó usando GC-QTOF-MS, lo que permitió también la identificación de

nuevos compuestos por medio de dos estrategias: utilizado la librería de espectros de alta resolución proporcionada por *Agilent Technologies* en la que se incluyen los espectros de 650 pesticidas o realizando la identificación de estos compuestos mediante el uso de la función *Find by Formula* (FBF) incluida en el software *Mass Hunter* de *Agilent Technologies* y comparando el patrón de fragmentación con la base de datos de espectros de baja resolución NIST. El procedimiento empleado de preparación de muestra es el que se indica en la Figura III.B.4. En la Publicación III.B.4 se recoge el trabajo realizado.

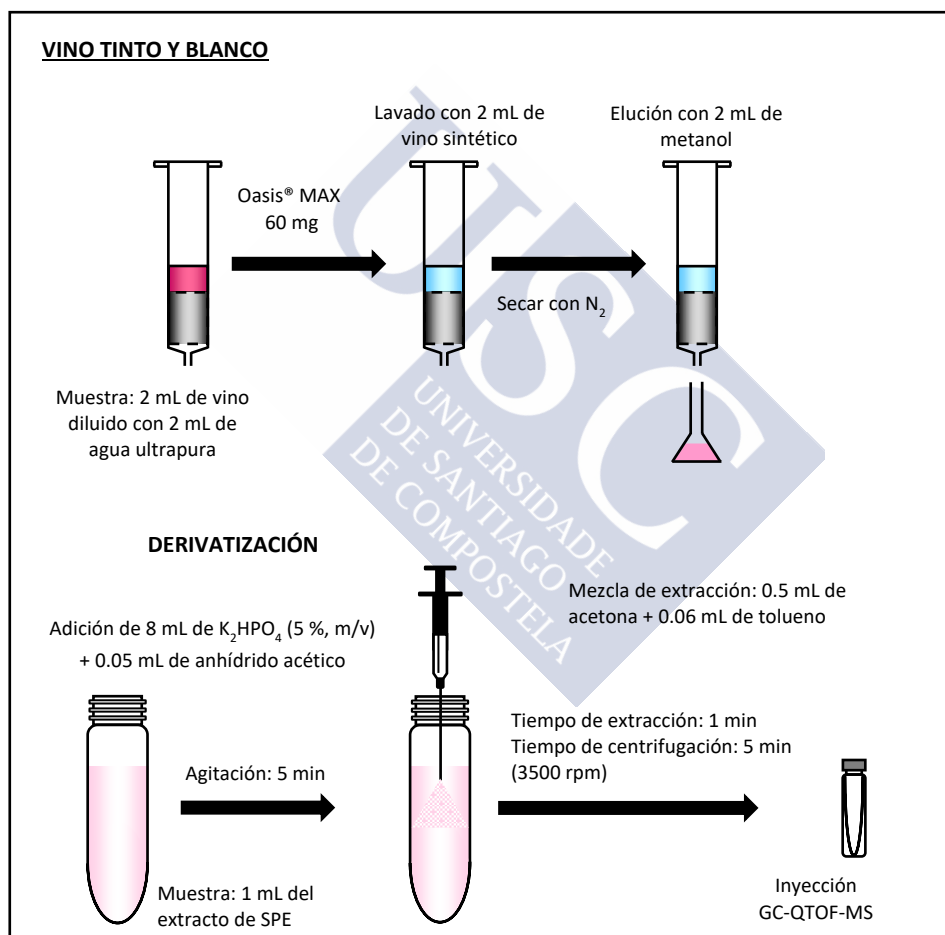


Figura III.B.4: Esquema del procedimiento para la determinación multianalito de compuestos relacionados con la calidad del vino.

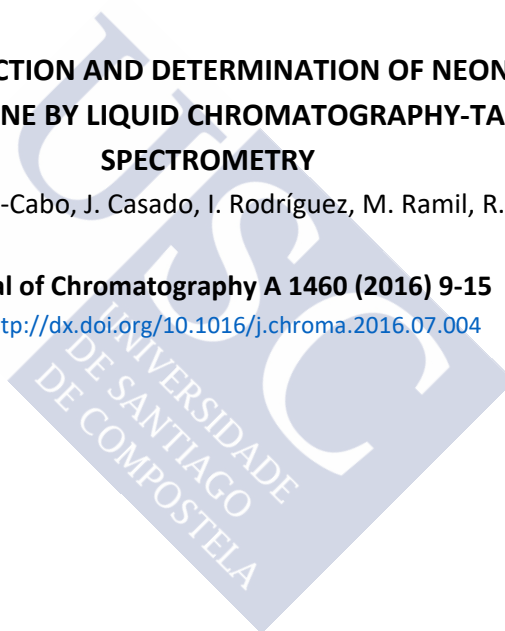
PUBLICACIÓN III.B.1

**SELECTIVE EXTRACTION AND DETERMINATION OF NEONICOTINOID
INSECTICIDES IN WINE BY LIQUID CHROMATOGRAPHY-TANDEM MASS
SPECTROMETRY**

T. Rodríguez-Cabo, J. Casado, I. Rodríguez, M. Ramil, R. Cela

Journal of Chromatography A 1460 (2016) 9-15

doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2016.07.004>





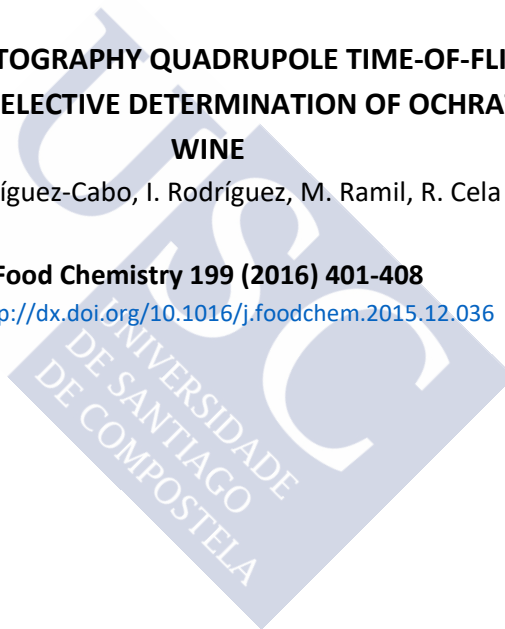
PUBLICACIÓN III.B.2

**LIQUID CHROMATOGRAPHY QUADRUPOLE TIME-OF-FLIGHT MASS
SPECTROMETRY SELECTIVE DETERMINATION OF OCHRATOXIN A IN
WINE**

T. Rodríguez-Cabo, I. Rodríguez, M. Ramil, R. Cela

Food Chemistry 199 (2016) 401-408

doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.12.036>





PUBLICACIÓN III.B.3

**INVESTIGATION OF LIQUID CHROMATOGRAPHY QUADRUPOLE TIME-
OF-FLIGHT MASS SPECTROMETRY PERFORMANCE FOR IDENTIFICATION
AND DETERMINATION OF HYDROXYLATED STILBENE ANTIOXIDANTS IN
WINE**

T. Rodríguez-Cabo, I. Rodríguez, P. López, M. Ramil, R. Cela

Journal of Chromatography A 1337 (2014) 162-170

doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2014.02.058>



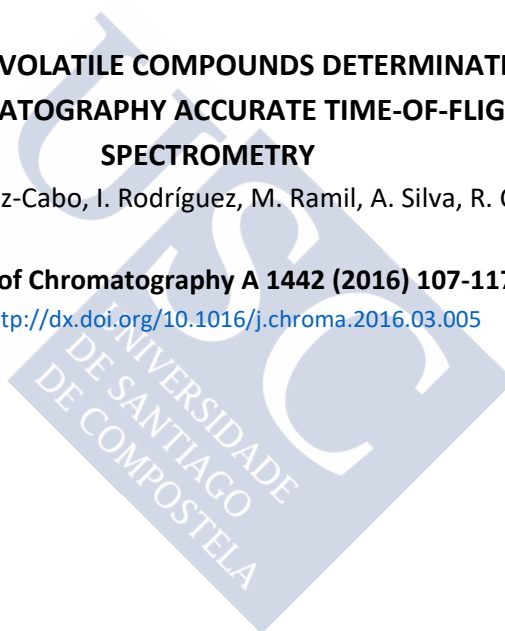
PUBLICACIÓN III.B.4

**MULTICLASS SEMI-VOLATILE COMPOUNDS DETERMINATION IN WINE
BY GAS CHROMATOGRAPHY ACCURATE TIME-OF-FLIGHT MASS
SPECTROMETRY**

T. Rodríguez-Cabo, I. Rodríguez, M. Ramil, A. Silva, R. Cela

Journal of Chromatography A 1442 (2016) 107-117

doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2016.03.005>







IV. ESTUDIOS DE ESTABILIDAD Y TRANSFORMACIÓN



Como se ha indicado en secciones anteriores, el uso de pesticidas en el sector vitivinícola favorece el crecimiento de la vid e incrementa la producción de la uva por su acción protectora ante la aparición de hongos, plagas de insectos o el crecimiento de malas hierbas. Uno de los inconvenientes de estos compuestos es que, una vez aplicados sobre la planta, debido a las condiciones ambientales a las que estén sometidos, tales como temperatura, humedad, lluvia o radiación solar, es posible su degradación para generar productos de transformación con una estructura química y con unas propiedades diferentes a las correspondientes a los principios activos aplicados inicialmente en el viñedo.

Las posibles reacciones de transformación de los fitosanitarios empleados en viticultura pueden ocurrir en diferentes matrices, desde la superficie de la propia planta (incluyendo la uva) hasta el medio ambiente de las explotaciones, incluyendo el propio suelo agrícola y el compartimento acuático (aguas subterráneas y superficiales). Las posibles reacciones de transformación ambientales, dependen del principio activo de partida (compuesto precursor), de la matriz considerada y de las condiciones ambientales, incluyendo entre otras reacciones, las promovidas o causadas por la luz. En una situación hipotética de contaminación de agua de consumo con pesticidas empleados en viticultura, resulta de interés evaluar su estabilidad durante los procesos oxidativos empleados en la potabilización de aguas y la identificación de posibles productos de transformación.

Además de la producción de vino, el sector vitivinícola es una fuente de productos secundarios de interés comercial en diferentes campos, tales como la elaboración de cosméticos y suplementos alimenticios. En general, los compuestos con un mayor interés comercial son los polifenoles con acción antioxidante. Entre ellos destaca el Resveratrol y otros derivados pertenecientes a la familia de los estilbenos. La información bibliográfica sobre este tipo de compuestos indica que son altamente susceptibles de transformaciones potenciadas por la luz; sin embargo, existe todavía una cantidad limitada de información sobre el número y la estructura de los productos de transformación generados.

En esta parte de la memoria se presentan los resultados obtenidos en estudios realizados con diferentes pesticidas y con derivados del Resveratrol al objeto de evaluar su

estabilidad en diferentes condiciones de trabajo e identificar posibles rutas de degradación. La metodología analítica empleada ha estado centrada en el uso de LC-QTOF-MS como técnica de determinación. La estabilidad de los compuestos precursores empleados en cada estudio se estimó en base a la evolución de la respuesta (concentración o señal cromatográfica) frente al tiempo. La identificación de los productos de transformación se llevó a cabo a través de la comparación de los registros de LC-MS, obtenidos con una elevada exactitud de masa, en controles y experimentos de degradación. Para ello se han empleado algoritmos de búsqueda de entidades moleculares en los cromatogramas de LC-QTOF-MS registrados en un amplio rango de relaciones m/z . Dichos algoritmos se encuentran implementados en el *software* (Mass Hunter) que controla el equipo de LC-QTOF-MS empleado, y en otros programas (Mass Profiler) encargados de la detección de diferencias entre cromatogramas. Una vez identificados los posibles productos de transformación y asignada la fórmula empírica más probable de los mismos, se han elucidado sus estructuras a través del análisis de fragmentos resultado de experimentos de masas-masas. Estos experimentos se han llevado a cabo empleando diferentes energías de colisión, registrando los correspondientes espectros en modo *product ion scan*.

A continuación se resume la metodología empleada en los trabajos realizados sobre procesos de fototransformación de varios pesticidas y de Resveratrol, así como la evaluación de la efectividad del cloro activo como sistema de eliminación de fungicidas en un escenario hipotético de contaminación de agua. Además, se incluyen las publicaciones científicas derivadas de los estudios realizados en esta línea de investigación.



IV.A. FOTOTRANSFORMACIÓN



En esta sección de la Tesis se presentan los estudios de estabilidad de pesticidas en disolución acuosa, en presencia de nitratos, y utilizando materiales poliméricos inertes en condiciones ambientales adecuados para el seguimiento de procesos de transformación con cinéticas relativamente lentas, capaces de retener tanto la fracción no degradada del compuesto de partida como los posibles productos de transformación. En el caso concreto del Resveratrol, los estudios de fototransformación se han llevado a cabo en disolución hidroalcohólica. Las fuentes de radiación consideradas han sido tanto luz ultravioleta (254 nm) como radiación solar.

1. ESTUDIO DE ESTABILIDAD DE FUNGICIDAS SOBRE MATERIALES POLIMÉRICOS

Una vez aplicados sobre las plantas, los productos fitosanitarios se descomponen en función de variables climáticas como la temperatura o la radiación solar que incide sobre ellos, generando distintos productos de transformación dependiendo del medio en el que se encuentren (agua, suelo o aire). Las cinéticas de estos procesos, e incluso las rutas de transformación, son también dependientes del medio en el que se encuentran estos fungicidas (agua, suelo, hojas y uva).

En este trabajo se ha evaluado el uso de siliconas como soporte para investigar la estabilidad ambiental de varios fungicidas. Este material ofrece entre otras ventajas, una buena estabilidad en condiciones de intemperie, bajo coste, capacidad de incorporar una concentración elevada de compuesto precursor, permeabilidad a la luz y distribución homogénea de los analitos (compuestos de partida y posibles productos de transformación) en el polímero, así como facilidad para recuperar los mismos con un mínimo volumen de disolvente orgánico.

Como compuestos modelo para evaluar la metodología anterior se han seleccionado tres fungicidas: Triadimenol (TR) y Difenconazol (DIF), pertenecientes a la familia de los azoles, reconocida como el grupo de fungicidas con mayor impacto ambiental, y la Fenhexamida (FEN). En cada uno de los experimentos realizados se ha utilizado un grupo

de soportes sobre los que se ha incorporado la misma cantidad de uno de los compuestos precursores tal y como se indica en la Figura IV.A.1. A continuación, los soportes se someten a diferentes condiciones, incluyendo controles oscuros, y se retiran a diferentes tiempos. La recuperación de los analitos se lleva a cabo bajo sonicación, con un pequeño volumen de disolvente compatible con una separación posterior mediante LC en fase reversa.

Posteriormente, las alícuotas de muestra obtenidas a distintos tiempos de reacción se inyectaron en el equipo de LC-MS, utilizando un analizador híbrido de tipo QTOF con el fin de obtener los tiempos de vida media ($t_{1/2}$) de los compuestos precursores e identificar los productos de transformación generados.

El procedimiento llevado a cabo para realizar este estudio se muestra en la Figura IV.A.1. Los resultados obtenidos se reflejan en la Publicación IV.A.1.

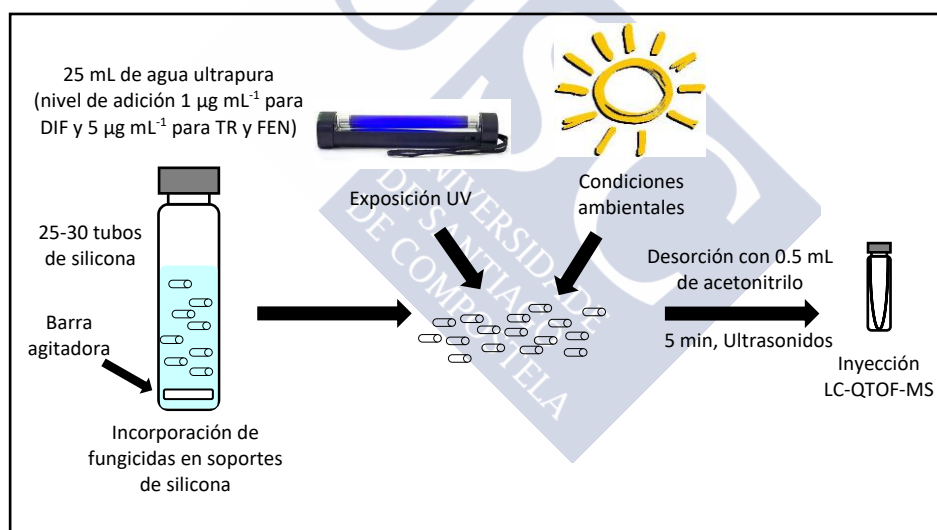


Figura IV.A.1: Esquema del estudio de transformación de TR, DIF y FEN utilizando siliconas como soporte.

2. ESTUDIO DE ESTABILIDAD DE FUNGICIDAS EN DISOLUCIÓN EN PRESENCIA DE NITRATOS

Las malas prácticas en la aplicación de productos fitosanitarios, los procesos de difusión atmosférica y el arrastre mediante aguas de escorrentía pueden provocar la contaminación de agua superficial con estos compuestos. Los procesos de fotólisis juegan un papel importante en la disipación de estos contaminantes en la capa superior de aguas superficiales. Además de los procesos de fotólisis directa, distintas especies de naturaleza orgánica e inorgánica, presentes en el agua, pueden dar lugar a especies reactivas, bajo acción de la luz, que aceleren las cinéticas de descomposición de contaminantes orgánicos. Entre estas especies se encuentran los nitratos, presentes de forma natural en el agua y cuya concentración se puede ver incrementada por el uso de fertilizantes en zonas agrícolas. Bajo acción de luz (solar o UV) los nitratos se descomponen generando radicales nitro e hidroxilo que pueden participar en reacciones posteriores con contaminantes orgánicos.

Los indicios obtenidos en el apartado anterior en relación a la formación de derivados nitrados de Fenhexamida en los soportes de silicona expuestos a condiciones atmosféricas, y la información bibliográfica relativa a la formación de nitro derivados de especies fenólicas en agua superficial bajo radiación solar, nos han llevado a evaluar si los fungicidas de la familia de las anilino pirimidinas son susceptibles también de este tipo de reacciones. Como compuesto modelo se ha escogido el Ciprodinil (CYP), ampliamente usado en viticultura en el tratamiento de *botrytis*. El anillo bencénico de este compuesto se encuentra activado frente a ataques electrófilos debido al efecto dador de electrones del grupo amino. Los resultados obtenidos para este compuesto son extrapolables a otros fungicidas de la misma familia tal y como se ha confirmado para el Pirimetanil (PYR). En la Figura IV.A.2 se indica el esquema del proceso llevado a cabo para realizar los estudios de transformación de CYP en agua de río en presencia de nitratos. Los niveles de nitrato empleados se han mantenido dentro del rango de valores esperados en aguas superficiales. Además, la formación de derivados nitrados se ha confirmado en muestras de agua superficial sin incrementar la concentración de este anión. El estudio realizado describe la estructura de los productos de transformación, así como su posterior resistencia a la

fotodegradación y una evaluación comparativa de su toxicidad con la del CYP usando el software TEST de la Agencia de Protección Ambiental (*Environmental Protection Agency*, EPA). En la Publicación IV.4.2 se muestran los resultados generados a partir de este trabajo.

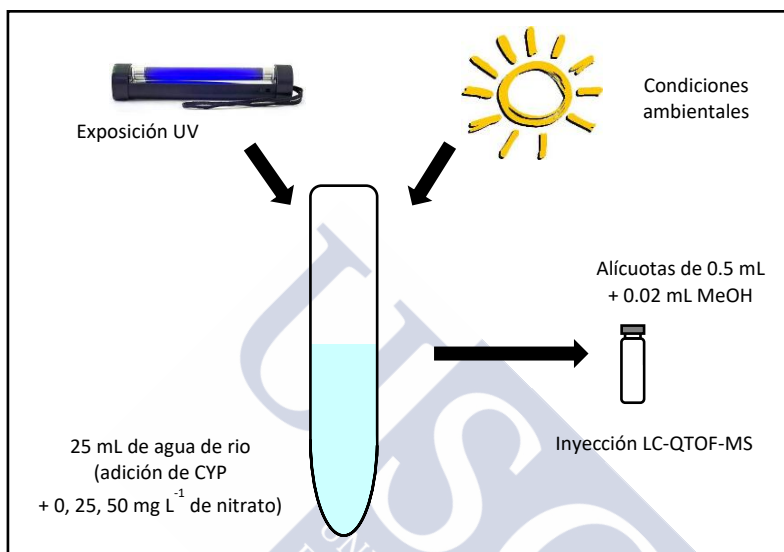


Figura IV.A.2: Esquema del estudio de transformación de CYP en agua de río en presencia de nitrato.

3. ESTUDIO DE ESTABILIDAD DE ESTILBENOS EN DISOLUCIÓN

En los últimos años se ha relacionado el consumo moderado de vino con la reducción del riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares debido a la disminución de los niveles de colesterol y de presión arterial de los consumidores. Se han atribuido estos efectos a las propiedades de los estilbenos, siendo el *trans*-Resveratrol el compuesto más estudiado, conociéndose ampliamente sus propiedades antioxidantes, anti-inflamatorias y anti-proliferativas de células tumorales. La acción antioxidante del Resveratrol y de otros estilbenos (ej. las viniferinas) ha atraído el interés, entre otras, de la industria cosmética que los ha incorporado en la formulación de diferentes productos de belleza para el tratamiento de la piel. Sin embargo, el Resveratrol es inestable en presencia de luz, de modo que bajo

estas condiciones se degrada a través de reacciones de isomerización, así como de formación de nuevos compuestos.

La actividad antioxidante depende de la estructura química de los estilbenos, así como de la forma isomérica. En este trabajo se ha estudiado el comportamiento del *trans*-Resveratrol bajo distintas fuentes de radiación. La metodología empleada ha consistido en la irradiación directa del compuesto en disoluciones hidroalcohólicas (Figura IV.A.3) que se analizan directamente por inyección en el sistema LC-QTOF-MS. De esta manera se evitan las posibles pérdidas de productos de transformación en etapas de preparación de muestra. Los resultados obtenidos en este estudio se recogen en la Publicación IV.A.3.

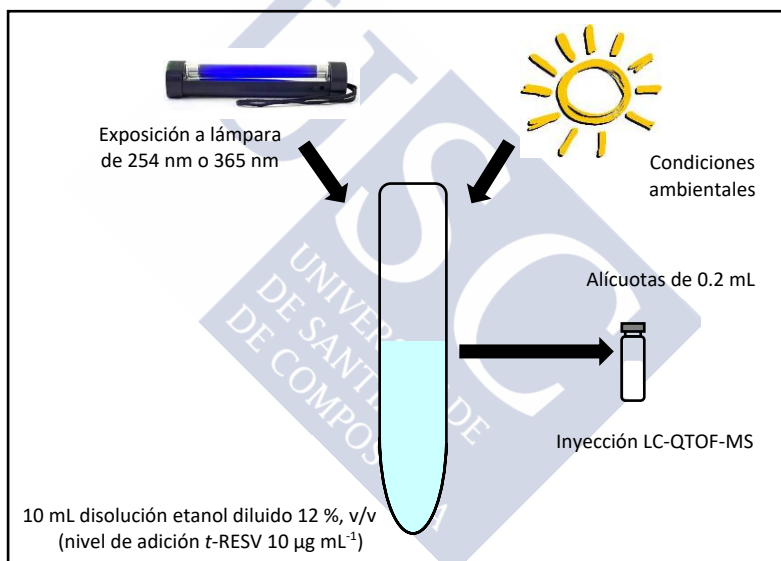


Figura IV.A.3: Esquema del estudio de estabilidad de *t*-RESV en disolución hidroalcohólica.



PUBLICACIÓN IV.A.1

**ASSESSMENT OF SILICONE AS SUPPORT TO INVESTIGATE THE
TRANSFORMATION ROUTES OF ORGANIC CHEMICALS UNDER
ENVIRONMENTAL CONDITIONS AND UV EXPOSURE. APPLICATION TO
SELECTED FUNGICIDES**

T. Rodríguez-Cabo, I. Rodríguez, M. Ramil, R. Cela

Analytical and Bioanalytical Chemistry 405 (2013) 4187-4198

doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-013-6821-5>



PUBLICACIÓN IV.A.2

**EVALUATION OF NITRATE EFFECTS IN THE PHOTODEGRADABILITY OF
CYPRODINIL. KINETICS STUDY AND TRANSFORMATION PRODUCTS
ELUCIDATION**

T. Rodríguez-Cabo, I. Rodríguez, M. Ramil, R. Cela

Analytical and Bioanalytical Chemistry 408 (2016) 4455-4464

doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-016-9543-7>





PUBLICACIÓN IV.A.3

**COMPREHENSIVE EVALUATION OF THE PHOTO-TRANSFORMATION
ROUTES OF *TRANS*-RESVERATROL**

T. Rodríguez-Cabo, I. Rodríguez, M. Ramil, R. Cela

Journal of Chromatography A 1410 (2015) 129-139

doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2015.07.088>







IV.B. REACCIONES CON CLORO



El uso de productos fitosanitarios en áreas de agricultura intensiva supone un riesgo para las masas de agua superficial y subterráneas. En determinadas situaciones podrían verse afectadas incluso las captaciones destinadas a la producción de agua para consumo humano. Dado que el cloro es el agente más empleado en la desinfección de agua de consumo, dentro de las actividades realizadas en esta Tesis se ha investigado también la estabilidad de diversos pesticidas en contacto con muestras de agua clorada. Para tres de los compuestos considerados en el estudio, Ciprodinil (CYP), Pirimetanil (PYR) y Fenhexamida (FEN) se han detectado cinéticas de eliminación relevantes, por lo que se ha considerado identificar y caracterizar los productos de transformación generados durante este proceso oxidativo. La metodología empleada implica de nuevo la inyección directa de las muestras en el equipo de LC-QTOF-MS, una vez eliminado el exceso de oxidante (cloro) para detener los procesos de oxidación. En la Figura IV.B.1 se muestra un esquema del procedimiento seguido y a continuación la publicación resultante de este estudio (Publicación IV.B.1).

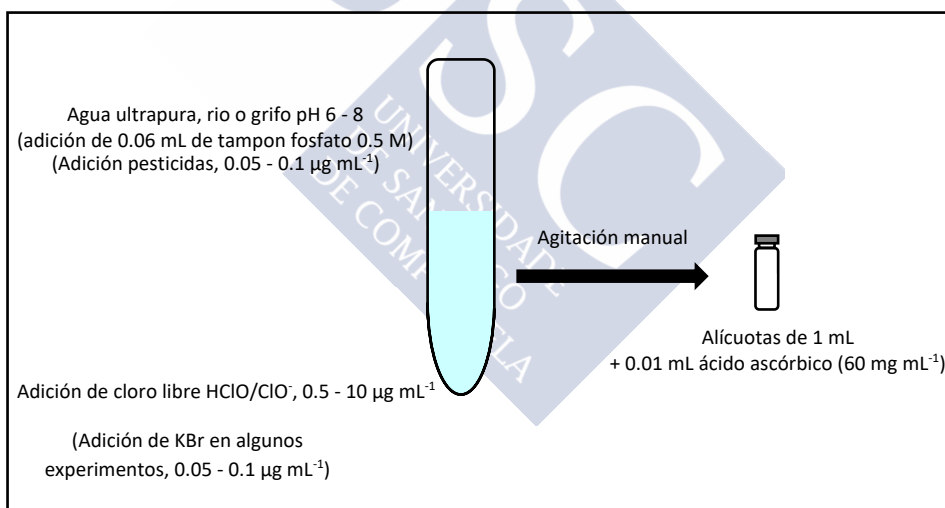


Figura IV.B.1: Esquema del estudio de estabilidad de fungicidas en presencia de cloro.



PUBLICACIÓN IV.B.1

**LIQUID CHROMATOGRAPHY TIME-OF-FLIGHT MASS SPECTROMETRY
EVALUATION OF FUNGICIDES REACTIVITY IN FREE CHLORINE
CONTAINING WATER SAMPLES**

T. Rodríguez-Cabo, M. Paganini, I. Carpinteiro, L. Fontenla, I. Rodríguez,
M.C. Pietrogrande, R. Cela

Journal of Mass Spectrometry 48 (2013) 216-226

doi: <http://dx.doi.org/10.1002/jms.3151>





V. DISCUSIÓN INTEGRADORA DE RESULTADOS



En esta Tesis se ha desarrollado metodología analítica para el análisis en vino de compuestos generados de manera natural en la vid (estilbenos y Ocratoxina A) y de productos de origen sintético que se aplican para su cuidado (Pesticidas: Fungicidas, Insecticidas y Herbicidas). Además, se ha estudiado la estabilidad de alguno de estos compuestos en distintas condiciones ambientales y en experimentos realizados en laboratorio, con el fin de conocer sus cinéticas de reacción e identificar los productos de transformación generados en las distintas condiciones estudiadas, que emulan las existentes en condiciones reales.

1. PREPARACIÓN DE MUESTRA

Para la extracción de los analitos de las muestras se han utilizado tanto técnicas no cuantitativas, la **microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME)**, como cuantitativas, la **extracción en fase sólida (SPE)**. Además, para el estudio de la estabilidad de pesticidas se ha empleado microextracción en fase sólida con materiales de bajo coste, como siliconas. Adicionalmente se han realizado estudios de degradación en medio acuoso (pesticidas) e hidroalcohólico (estilbenos).

DLLME se aplicó a la extracción de fungicidas y estilbenos en muestras de vino tinto y blanco. En el primer caso, como se indica en la **PUBLICACIÓN III.A.1**, se trabajó con la modalidad de solidificación de gota flotante (DLLME-SFO) utilizando como agente extractante 1-undecanol, evitando de esta manera los problemas de precipitación detectados para extractantes convencionales (disolventes halogenados con densidad superior a 1 g mL^{-1}) cuando se aplican a muestras de vino sin diluir. La eficacia de extracción (EE) para los analitos fue superior al 58 %, excepto para MET (EE 8%) debido a su carácter hidrofílico ($\log K_{ow} 1.76$). Para la extracción de los estilbenos, el primer paso fue la derivatización, en la muestra de vino diluida, con anhídrido acético en medio básico previamente a la etapa de concentración mediante DLLME con un disolvente halogenado. En este caso, las EEs fueron superiores al 93 % (**PUBLICACIÓN III.A.2**).

En SPE, la selección del adsorbente depende de la naturaleza de la muestra y el tipo de analitos de modo que, en el caso de los compuestos seleccionados, se han utilizado para

su extracción los materiales desarrollados por *Waters Corporation* de fase reversa, OASIS® HLB y materiales de modo mixto OASIS® MAX, además del uso de materiales en fase normal como Florisil, empleado en la **PUBLICACIÓN III.B.1**, para la limpieza de los extractos obtenidos con recuperaciones entre 96 y 108 %.

Teniendo en cuenta el pH de las muestras de vino (3.5 - 3.9), en el caso de la OTA, la forma que predomina en esas condiciones es la neutra (pK_a 3.29 y -2.20 para su grupo ácido y básico, respectivamente), por lo que al utilizar adsorbentes de fase reversa como los materiales OASIS® HLB en combinación con el uso de acetato de etilo como disolvente de elución se obtienen recuperaciones superiores al 97 %, con escasos cambios en la eficacia de extracción entre extractos de muestra y patrones (**PUBLICACIÓN III.B.2**). Los estilbenos, con valores de pK_a superiores a 9.17, pueden ser extraídos en su forma neutra con el mismo tipo de adsorbente (OASIS® HLB), sin embargo, debido a los efectos de matriz obtenidos en vino tinto, mostrados en la **PUBLICACIÓN III.B.3**, se utilizó un material de fase mixta tipo OASIS® MAX para este tipo de vino y se mantuvo el uso de materiales de fase reversa para vino blanco. Las recuperaciones, en ambos casos, fueron superiores a 86 %. En el caso del método multianalito, descrito en la **PUBLICACIÓN III.B.4**, SPE se utiliza como etapa previa antes de la concentración con DLLME. El uso de adsorbentes de modo mixto (OASIS® MAX) en la primera etapa del proceso de preparación de muestra permite incrementar su selectividad dado que compuestos altamente polares (ej. Monosacáridos y especies con un elevado número de hidroxilos) existentes en el vino no se recuperan en la etapa de elución. De esta forma se consigue un extracto más "limpio" para su inyección en GC-MS, a la vez que se facilita la separación de fases en DLLME.

2. ESTUDIOS DE ESTABILIDAD

Para fungicidas, se ha evaluado su comportamiento fotoquímico utilizando (1) un material de bajo coste como soporte de estos compuestos del modo indicado en la **PUBLICACIÓN IV.A.1**, y (2) en matrices acuosas (agua ultrapura y superficial) fortificadas con estos compuestos y cantidades conocidas de nitratos, **PUBLICACIÓN IV.A.2**. Además, se ha estudiado la reactividad de estos compuestos en disolución en presencia de cloro (**PUBLICACIÓN IV.B.1**). En las dos primeras aplicaciones, tanto los tubos de silicona

impregnadas con los compuestos considerados (FEN, TR, DIF) como las disoluciones acuosas de CYP, se exponen a radiación UV o a condiciones ambientales, recogiendo alícuotas de muestra a distintos tiempos. Bajo radiación UV, las reacciones de transformación son más rápidas, con tiempos de vida media ($t_{1/2}$) de 5 a 100 minutos para FEN, TR y DIF (**PUBLICACIÓN IV.A.1**). En condiciones ambientales, los $t_{1/2}$ varían dependiendo de la radiación recibida por lo que, experimentos realizados en Julio y Octubre, tienen un valor de $t_{1/2}$ para FEN de 30 y 80 horas, respectivamente. Para las reacciones de fototransformación de CYP en presencia de nitrato, dependiendo de las características del agua utilizada, tales como pH, carbón orgánico e inorgánico disuelto y contenido en aniones inorgánicos, la reacción es más o menos rápida. En todos los casos, la presencia y/o la adición de nitratos redujo el $t_{1/2}$ del CYP (**PUBLICACIÓN IV.A.2**). Al igual que en este caso, al aumentar también la concentración de la sustancia reactiva (**PUBLICACIÓN IV.B.1**), en este caso cloro, la reacción de transformación de los pesticidas FEN, CYP y PYR es más rápida, siendo el FEN el compuesto más reactivo, con vidas medias entre 1.2 y 13 minutos.

Para finalizar, en esta Tesis se han estudiado las rutas de fototransformación de *trans*-Resveratrol (**PUBLICACIÓN IV.A.3**) en disolución hidroalcohólica (agua ultrapura con un 12 % de etanol), bajo exposición a radiación UV (254 y 365 nm) y en condiciones ambientales, operando del mismo modo que en el caso de los experimentos de pesticidas en presencia de nitrato (**PUBLICACIÓN IV.A.2**). En estos experimentos el *t*-RESV se isomeriza a la forma *cis*, degradándose ambos isómeros en condiciones ambientales y bajo radiación UV a 254 nm, mientras que en el caso de radiación a 365 nm, se alcanza un equilibrio entre las dos formas, permaneciendo constante a tiempos más altos.

3. DETERMINACIÓN

Una vez realizados los experimentos indicados anteriormente, los extractos obtenidos se analizaron utilizando cromatografía de gases (GC) y líquidos (LC), acopladas en todos los casos a espectrometría de masas, empleando equipos de baja resolución así como otros que proporcionan masas exactas.

En el caso de los fungicidas y estilbenos, extraídos previamente utilizando DLLME con los procedimientos indicados en las **PUBLICACIÓN III.A.1** y **PUBLICACIÓN III.A.2**, se inyectaron en sistemas GC-MS utilizando analizadores de trampa de iones y cuadrupolar, respectivamente. En el caso de los estilbenos, para la identificación y cuantificación se utilizaron las relaciones m/z correspondientes al pico base en el espectro de los compuestos acetilados (fragmentos $[M-42]^+$). Los LOQ obtenidos en ambos casos son de 0.2 y 3.2 ng mL⁻¹ para fungicidas y 0.6 a 5 ng mL⁻¹ para estilbenos. Para pesticidas, estos LOQ obtenidos se redujeron en la **PUBLICACIÓN III.B.4** con valores inferiores a 1.4 ng mL⁻¹.

El uso de LC presenta varias ventajas para la determinación de estilbenos tales como la eliminación de la etapa de derivatización, la posibilidad de detectar el derivado glicosilado, PICE, el cual es inestable para su medida por GC y la identificación de nuevos compuestos derivados de estos. La combinación de SPE con LC-QTOF-MS (**PUBLICACIÓN III.B.3**), ofrece unos LOQ para estilbenos de 3 a 20 ng mL⁻¹, similares a los obtenidos con un sistema LC-QqQ-MS [1] e inferiores a los obtenidos para la inyección directa de muestras de vino filtradas (LOQ 150 ng mL⁻¹) [2]. Para la OTA, la mayoría de las aplicaciones desarrolladas previamente se basan en uso de LC-FLD precedida por una etapa de extracción con inmunoabsorbentes [3], debido a la limitada selectividad de la detección mediante fluorescencia. En esta Tesis se ha desarrollado un método alternativo, descrito en la **PUBLICACIÓN III.B.2**, que utiliza SPE en fase reversa combinada con LC-QTOF-MS con unos LOQ de 0.05 ng mL⁻¹, lo que permite la detección de OTA en vino, a niveles inferiores de los legislados (2 ng mL⁻¹) con un coste inferior al de las columnas de inmunoafinidad. Para pesticidas neonicotinoides, el uso de SPE con adsorbentes de fase reversa seguido del análisis por LC-QqQ-MS permite obtener LOQ entre 0.2 y 0.8 ng mL⁻¹, valores más bajos que los descritos anteriormente en la bibliografía (**PUBLICACIÓN III.B.1**) [4,5]. En parte, este hito es debido a la práctica ausencia de efectos de atenuación de señal en la interfase de ESI en las condiciones descritas en el trabajo anterior.

Para el análisis de los extractos resultantes de los estudios de estabilidad de pesticidas y estilbenos se utilizó el sistema LC-QTOF-MS, utilizando para pesticidas, ionización en modo positivo ([ESI+]) y en modo negativo para estilbenos ([ESI-]). En todos estos trabajos, el primer paso fue la inyección de alícuotas de muestra (ensayos de degradación en

medio acuoso), o extractos (degradación en soportes de silicona), a distintos tiempos de reacción, en modo MS *full scan* en un intervalo de 50 o 100 hasta 1700 unidades de m/z , con el fin de seguir la eliminación de los compuestos precursores y detectar la formación de productos de transformación (TPs). Después de esto, se obtienen los espectros de MS/MS con energías de colisión de 5 a 40 eV para conocer la fragmentación del ion precursor, $[M+H]^+$ o $[M-H]^-$, de manera que la elucidación estructural se realiza en base al patrón de fragmentación en MS/MS, la exactitud de masas de los iones producto y la abundancia isotópica en los espectros de MS y MS/MS de los compuestos de transformación.

4. PRESENCIA DE PESTICIDAS, OTA Y ESTILBENOS EN VINO

Los métodos desarrollados en esta tesis se aplicaron a la determinación de contaminantes y compuestos de origen natural en vino tinto y blanco, utilizando también muestras de vino dulce durante el análisis de OTA. Aunque en otros trabajos se ha detectado la presencia de este compuesto en vino tinto [6,7], en este caso, solo los vinos dulces están contaminados con concentraciones de OTA en el rango de 0.09 a 1 ng mL⁻¹ (**PUBLICACIÓN III.B.2**). El modo de elaboración del vino también influye en los niveles detectados de estilbenos, por lo que, los vinos blancos en los que, durante la fermentación, la parte sólida de la uva se retira después de su prensado, la concentración de estos compuestos es menor que la obtenida en vino tinto, donde, después del prensado de la uva, ésta fermenta con el mosto. De esta manera, en las muestras de vino blanco empleadas, la suma de concentración para estilbenos varía desde 1.0 (**PUBLICACIÓN III.A.2**) a 828 ng mL⁻¹ (**PUBLICACIÓN III.B.3**) y en el caso de vino tinto desde 340 ng mL⁻¹ hasta concentraciones superiores a 16 µg mL⁻¹, determinados en la **PUBLICACIÓN III.B.3**.

Para pesticidas, en el caso de los neonicotinoides, sólo IMI fue detectado en muestras de vino blanco, con niveles de concentración indicados en la **PUBLICACIÓN III.B.1**, comprendidos entre 0.40 and 14.2 ng mL⁻¹, similares a los descritos en la bibliografía [8]. En todas las muestras de vino procesadas, la respuesta de los compuestos azólicos fue inferior a los LOQs de los métodos desarrollados. De otra banda, los agentes anti-*mildium* IP y MET y los anti-botríticos FEN, PYR, CYP e IPR, no son eliminados durante la etapa de vinificación, y se cuantificaron en el 50 % de las muestras, aunque en valores inferiores a la décima parte

de los MRLs en vino, recomendados por la OIV. En estos estudios, la concentración más alta (278 ng mL⁻¹) de un pesticida individual medida en el vino correspondió al fungicida IP (**PUBLICACIÓN III.A.1**).

5. PRODUCTOS DE TRANSFORMACIÓN GENERADOS

Para *t*-RESV, la primera ruta de transformación es la isomerización a la forma *cis*. Posteriormente, la degradación de ambos isómeros se produce principalmente por dos rutas (**PUBLICACIÓN IV.A.3**): (1) hidroxilación del doble enlace con posterior formación de una cetona y finalmente, rotura de la molécula obteniendo dos aldehídos, (2) ciclación de la forma *c*-RESV, obteniendo un fenantreno hidroxilado, que tras su oxidación genera una *orto*-diquinona. Además, bajo condiciones ambientales y a partir solamente de la forma *cis*, se confirma la generación de la resveratrina [9].

Las rutas de transformación de los pesticidas FEN, TR y DIF (**PUBLICACIÓN IV.A.1**) utilizando soportes de silicona, incluyen reacciones de hidroxilación, de cloración, rotura de enlaces, ciclación intramolecular y oligomerizaciones, generando 18 productos de transformación. Algunos de estos compuestos han sido descritos anteriormente en la bibliografía [10] y su formación se observó también en estudios de cloración de FEN, CYP y PYR (**PUBLICACIÓN IV.B.1**), en donde, además de obtenerse principalmente derivados clorados y bromados de los tres compuestos, para FEN se obtuvo también un compuesto generado a partir de la rotura del enlace entre nitrógeno y carbono de uno de los anillos aromáticos. Los aniones nitrato, a niveles de concentración presentes en agua superficial, son capaces de acelerar las reacciones de fotodegradación del CYP (y por extensión del PYR). No obstante, entre los productos de transformación generados se han detectado derivados nitrados aromáticos, más estables que los fungicidas de partida y con una toxicidad estimada también superior (**PUBLICACIÓN IV.A.2**).

REFERENCIAS

- [1] M. Careri, C. Corradini, L. Elviri, I. Nicoletti, I. Zagnoni, Liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry of *cis*-Resveratrol and *trans*-Resveratrol: development, validation, and application of the method to red wine, grape, and winemaking byproducts, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 6868-6874.
- [2] F. Buiarelli, F. Coccioli, R. Jasionowska, M. Merolle, A. Terracciano, Analysis of some stilbenes in Italian wines by liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21 (2007) 2955-2964.
- [3] R. Remiro, M. Ibáñez-Vea, E. González-Peñas, E. Lizarraga, Validation of a liquid chromatography method for the simultaneous quantification of Ochratoxin A and its analogues in red wines, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 8249-8256.
- [4] R. Romero-González, A. Garrido Frenich, J.L. Martínez Vidal, O.D. Prestes, S.L. Grió, Simultaneous determination of pesticides biopesticides and mycotoxins in organic products applying a quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction procedure and ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 1477-1485.
- [5] P. Pérez-Ortega, B. Gilbert-López, J.F. García-Reyes, N. Ramos-Martos, A. Molina-Díaz, Generic sample treatment method for simultaneous determination of multiclass pesticides and mycotoxins in wines by liquid chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1249 (2012) 32-40.
- [6] Y. Sarigiannis, J. Kapolos, A. Koliadima, T. Tsegenidis, G. Karaiskakis, Ochratoxin A level in Greek retail wines, *Food Control* 42 (2014) 139-143.
- [7] J. Cao, W. Kong, S. Zhou, L. Yin, L. Wan, M. Yang, Molecularly imprinted polymer-based solid phase clean-up for analysis of Ochratoxin A in beer, red wine, and grape juice, *J. Sep. Sci.* 36 (2013) 1291-1297.
- [8] K. Zhang, J.W. Wong, D.G. Hayward, P. Sheladia, A.J. Krynitsky, F.J. Schenck, M.G. Webster, J.A. Ammann, S.E. Ebeler, Multiresidue pesticide analysis of wines by

- dispersive solid-phase extraction and ultrahigh-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 4019-4029.
- [9] I. Yang, E. Kim, J. Kang, H. Han, S. Sul, S.B. Park, S.K. Kim, Photochemical generation of a new, highly fluorescent compound from non-fluorescent Resveratrol, *Chem. Commun.* 48 (2012) 3839-3841.
- [10] C. Anderson, B. Brumhard, K. Ditzgen, H. Reiner, Metabolism of Fenhexamid (KBR 2738) in plants, animals, and environment, *Pflanzenschutz-Nachr. Bayer* 52 (1999) 227-251.





VI. CONCLUSIONES



En esta memoria de Tesis se han presentado los desarrollos de metodología analítica para la determinación de pesticidas, utilizados para el cuidado de la vid con la finalidad de mejorar la producción y calidad de la uva obtenida y, como resultado, la del vino. También se han estudiado procedimientos de análisis de compuestos naturales como los estilbenos, originados por las plantas ante situaciones de estrés como puede ser la presencia de hongos o la incidencia de radiación UV en la vid y, la Ocratoxina A, una micotoxina producida por las especies de hongos de tipo *Aspergillus* y *Penicillium*. Además de considerar diferentes aproximaciones para la preparación de las muestras, se ha empleado espectrometría de masas con diferentes fuentes de ionización y analizadores de masas.

En relación con las potenciales implicaciones ambientales de los pesticidas empleados en viticultura, se han considerado diferentes escenarios en los que se han evaluado sus rutas de transformación. Dado el interés comercial en la utilización de estilbenos, y más concretamente del Resveratrol, en productos de cuidado personal y films para el recubrimiento de alimentos se han evaluado también las rutas de fototransformación de estos compuestos. En este tipo de estudios (búsqueda de productos de transformación) se han empleado de manera sistemática espectrómetros de masas híbridos de tipo QTOF, combinados con estrategias semi-automáticas de búsqueda de productos de transformación. A continuación se resumen, de forma genérica, las principales conclusiones derivadas del trabajo realizado en lo referente a las capacidades de las metodologías analíticas y los resultados obtenidos para las diferentes familias de compuestos y/o estudios de transformación realizados.

La metodología de DLLME en la modalidad de SFO permite la extracción y concentración de muestras de vinos blancos y tintos sin problemas de separación entre la fase acuosa y la orgánica. No obstante, los extractantes disponibles en esta modalidad poseen polaridades muy bajas y elevados puntos de ebullición. Su aplicación se limita a pesticidas semivolátiles de polaridad media y baja. Los problemas de separación de fases en DLLME de muestras de vino se agravan cuando es preciso elevar el pH de las muestras (por ejemplo, para llevar a cabo acetilaciones) antes o simultáneamente a la etapa de concentración. Por tanto, las máximas prestaciones de DLLME se han obtenido en combinación con una etapa previa de SPE para eliminar compuestos que dificultan la

separación de fases. En relación a los diferentes extractantes considerados en esta tesis, el tolueno ofrece unas prestaciones similares a los disolventes halogenados con una menor toxicidad.

En relación a los diferentes sistemas GC-MS empleados en combinación con DLLME para la determinación de pesticidas, estilbenos y otros compuestos (defectos sensoriales y/o contaminantes antropogénicos), es evidente que GC-QTOF-MS es la técnica que ofrece unas mejores prestaciones en cuanto a selectividad, número ilimitado de compuestos a cuantificar en la misma inyección y LOQs similares a los de GC-SIM-MS. Por otro lado, en el momento de la realización de este estudio, los sistemas de tratamiento de datos para la identificación *post-target* de nuevos compuestos de interés en los registros de GC-EI-TOF-MS no están desarrollados. Así pues, es muy difícil, por no decir imposible, explotar las capacidades cualitativas de la combinación GC-EI-QTOF-MS.

En lo referente a las determinaciones cuantitativas realizadas mediante LC-MS, empleado triples cuadrupolos y QTOF, SPE es, sin duda, la técnica de preparación por excelencia. Las diferentes combinaciones adsorbente/eluyente evaluadas han posibilitado obtener recuperaciones cuantitativas, minimizando las variaciones en la eficacia de ionización en la fuente ESI entre disoluciones patrón y los extractos de las diferentes muestras de vino consideradas en esta Tesis. La ventaja clara de QTOF es la posibilidad de explorar de manera rápida en los cromatogramas la presencia de especies “sospechosas” relacionadas estructural y/o biosintéticamente con los analitos principales considerados en el estudio. Algunos ejemplos reflejados en esta memoria de Tesis son la existencia de un éster etílico de la OTA en vinos dulces contaminados con esta toxina, y la identificación de derivados oxidados y reducidos de estilbenoides en muestras de vino.

Los métodos cuantitativos desarrollados en esta tesis han puesto de manifiesto la presencia de niveles preocupantes de un número considerable de pesticidas en vino. Mayoritariamente estos compuestos son fungicidas (Iprovalicarb, Ciprodinil, Metalaxil, Pirimetanil), aunque también se ha detectado el empleo del insecticida Imidacloprid en viticultura a través de la presencia de residuos de este compuesto en vino. La presencia de OTA se ha detectado solo en muestras de algunos vinos dulces a niveles inferiores a los

niveles máximos permitidos. En relación a la determinación de estilbenos se confirma la complejidad de esta familia química, con diferentes tipos de derivados presentes en vino, algunos de ellos descritos por primera vez en los estudios realizados en esta Tesis.

Los diferentes ensayos de transformación considerados a lo largo de esta Tesis ponen de manifiesto la utilidad de LC-QTOF-MS para la identificación y caracterización estructural de los productos de transformación de los diferentes compuestos considerados. El empleo de precursores marcados con isótopos estables resulta muchas veces fundamental para identificar la región de una determinada molécula implicada en algún tipo de transformación.

Los resultados concretos obtenidos en la segunda parte de la memoria conllevan una serie de conclusiones particulares que se enumeran en los siguientes párrafos.

La isomerización *E/Z* del Resveratrol es solo la primera de las etapas implicadas en la fototransformación de este compuesto. Algunos de los derivados identificados en esta Tesis presentan grupos funcionales y/o estructuras cuya seguridad o potencial toxicidad merece una investigación detallada, en concreto los compuestos derivados del fenantreno y las quinonas.

Los niveles de nitratos existentes en agua superficial son suficientes para afectar las cinéticas de descomposición de los fungicidas Ciprodinil y Pirimetanil mediante procesos de fotólisis indirecta en los que participan radicales hidroxilo y nitro. El hallazgo más alarmante en este estudio ha sido la formación de derivados nitrados bajo la acción de la radiación solar, en muestras de agua fortificadas exclusivamente con los fungicidas.

Los tratamientos a base de cloro resultan poco eficaces para la eliminación de fungicidas en muestras de agua. Aún en el caso de compuestos con cinéticas de oxidación favorables, la identificación y posterior evaluación de la estabilidad de los productos de transformación generados resulta imprescindible para entender el comportamiento de estos contaminantes en el caso de alcanzar el medio acuático.

La capacidad de los soportes de silicona para seguir las cinéticas de transformación e identificar productos de transformación, generados en condiciones de intemperie, de

varios fungicidas ha sido demostrada en esta Tesis. Esta capacidad podría ser útil para entender, en estudios a medio y largo plazo, la interacción de estos compuestos con los agentes atmosféricos (luz, agua, especies radicalarias) en el ámbito del viñedo. Los estudios posteriores deberían centrarse en la búsqueda de productos de transformación comunes en estos soportes y en la superficie de la planta (hojas y racimos).





ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS



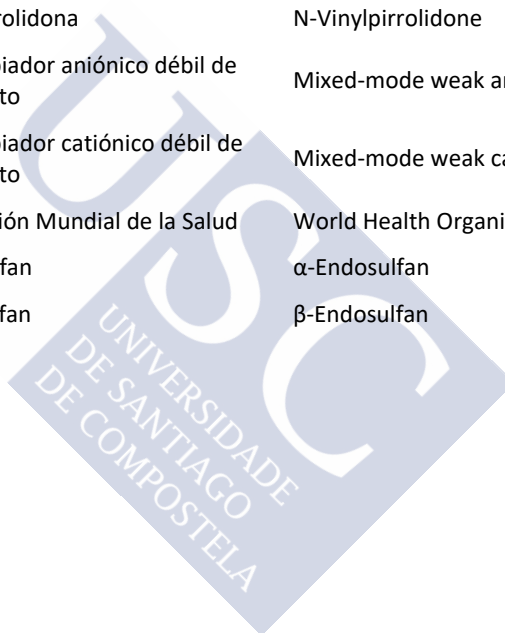
%R	Recuperación (%)	% Recovery
ACE	Acetamiprid	Acetamiprid
ACN	Acetonitrilo	Acetonitrile
AcOEt	Acetato de etilo	Ethyl acetate
APCI	Ionización química a presión atmosférica	Atmospheric pressure chemical ionization
APPI	Fotoionización a presión atmosférica	Atmospheric pressure photoionization
AZO	Azoxystrobin	Azoxystrobin
BEN	Benalaxil	Benalaxyl
BSTFA	<i>N,O</i> -Bis-(trimetilsilil)trifluoroacetamida	<i>N,O</i> -Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide
C18	Octadecilsilano	Octadecylsilane
CCl ₄	Tetracloruro de carbono	Carbon tetrachloride
CI	Ionización química	Chemical ionization
CID	Disociación inducida por colisión	Collision-induced dissociation
CLE	Etil Chlorpirifos	Chlorpyrifos ethyl
CLM	Metil Chlorpirifos	Chlorpyrifos methyl
CLO	Clotianidin	Clothianidin
c-RESV	<i>cis</i> -Resveratrol	<i>cis</i> -Resveratrol
CYP	Ciprodinil	Cyprodinil
DAD	Detector de array de diodos	Diode array detector
DI	Diniconazol	Diniconazole
DIF	Difenoconazol	Difenoconazole
DI-SPME	Microextracción en fase sólida mediante inmersión directa	Direct immersion solid-phase microextraction
DLLME	Microextracción líquido-líquido dispersiva	Dispersive liquid-liquid microextraction
DLLME-SFO	DLLME basada en la solidificación de gota flotante	DLLME based on the solidification of a floating organic drop
DVB	Divinilbenceno	Divinylbenzene
DZP	Adsorbentes de fase de doble zona	Dual-Zone phase

ECD	Detector de captura electrónica	Electron capture detector
EDR	Endrin	Endrin
EE	Eficacia de extracción	Extraction efficiency
EF	Factor de enriquecimiento	Enrichment factor
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria	European Food Safety Authority
EI	Ionización electrónica	Electronic ionization
ESI	Ionización por electrospray	Electrospray ionization
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura	Food and Agriculture Organization of United Nations
FEN	Fenhexamida	Fenhexamid
FID	Detector de ionización de llama	Flame ionization detector
FLD	Detector de fluorescencia	Fluorescence detector
FLU	Flusilazol	Flusilazole
FLUD	Fludioxonil	Fludioxonil
FPSE	Extracción con polímeros modificados químicamente	Fabric phase sorptive extraction
GC	Cromatografía de gases	Gas chromatography
GCB	Carbón negro grafitizado	Graphitized carbon black
HLB	Balance hidrofílico lipofílico	Hydrophilic lipophilic balance
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta eficacia	High performance liquid chromatography
HS-SPME	Microextracción en fase sólida en espacio de cabeza	Headspace-solid phase microextraction
IAC	Columnas de inmutaafinidad	Immunoaffinity columns
IARC	Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer	International Agency for Research on Cancer
IMI	Imidacloprid	Imidacloprid
IP	Iprovalicarb	Iprovalicarb
IPR	Iprodiona	Iprodione
K_{ow}	Constante de distribución octanol-agua	Octanol-water partition constant

LC	Cromatografía de líquidos	Liquid chromatography
LIT	Trampa de iones lineal	Linear ion trap
LLE	Extracción líquido-líquido	Liquid-liquid extraction
LOD	Límite de detección	Limit of detection
LOQ	Límite de cuantificación	Limit of quantification
LPME	Microextracción en fase líquida	Liquid-Phase Microextraction
m/z	Relación masa/carga	Mass/charge ratio
MA	Metacrilato	Methacrylate
MAX	Intercambiador aniónico de modo mixto	Mixed-mode anion exchange
MCX	Intercambiador catiónico de modo mixto	Mixed-mode cation exchange
MeOH	Metanol	Methanol
MEPS	Microextracción con adsorbentes empaquetados	Microextraction in packed sorbent
MET	Metalaxil	Metalaxyl
MIPs	Polímeros de impresión molecular	Molecular imprinted polymer
MRL	Límite máximo de residuos	Maximun residue limit
MS	Espectrometría de masas	Mass spectrometry
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem	Tandem mass spectrometry
MYC	Miclobutanil	Myclobutanil
NIST	Instituto Nacional de Estándares y Tecnología	National Institute of Standards and Technology
OIV	Organización Internacional de la Viña y el vino	International Organisation of Vine and Wine (Organisation Internationale de la Vigne el du Vin)
OTA	Ocratoxina A	Ochratoxin A
PA	Poliacrilato	Polyacrilate
PDMS	Polidimetilsiloxano	Polydimethylsiloxane
PEG	Polietilenglicol	Polyethylenglycol
PEN	Penconazol	Penconazole
PES	Polietersulfona	Polyethersulfone

PICE	<i>trans</i> -Piceido	<i>trans</i> -Piceid
PICEA	<i>trans</i> -Piceatanol	<i>trans</i> -Piceatannol
PP	Polipropileno	Polypropylene
PRC	Prochloraz	Prochloraz
PRO	Propiconazol	Propiconazole
PRY	Procimidona	Procymidone
PS	Poliestireno	Polystyrene
PSA	Amina primaria y secundaria	Primary and secondary amine
PTERO	<i>trans</i> -Pterostilbeno	<i>trans</i> -Pterostilbene
PTV	Vaporización con programación de temperatura	Programmable temperature vaporization
PY	Piraclostrobin	Pyraclostrobin
PYR	Pirimetanil	Pyrimethanil
Q	Cuadrupolo	Quadrupole
QIT	Trampa de iones cuadrupolo	Quadrupole ion trap
QqQ	Triple cuadrupolo	Triple quadrupole
QTOF	Cuadrupolo-Tiempo de vuelo	Quadrupole time-of-flight
RAM	Materiales de Acceso Restringido	Restrictes-access material
SBSE	Microextracción en fase sólida con barra agitadora	Stir bar sorptive extraction
SHP	Adsorbentes hidrofóbicos de embalaje blindado	Shielded hydrophobic packings
SIM	Monitorización del ión seleccionado	Selected ion monitoring
SPE	Extracción en fase sólida	Solid-phase extraction
SPME	Microextracción en fase sólida	Solid-phase microextraction
SPS	Adsorbentes de superficie semipermeables	Semipermeable Surface
$t_{1/2}$	Tiempo de vida media	Half-life time
TEB	Tebuconazol	Tebuconazole
TEF	Teflubenzuron	Teflubenzuron
THC	Tiacloprid	Thiacloprid

THM	Tiametoxam	Thiamethoxam
TOF	Tiempo de vuelo	Time-of-flight
TR	Triadimenol	Triadimenol
<i>t</i> -RESV	<i>trans</i> -Resveratrol	<i>trans</i> -Resveratrol
TRF	Trifluralin	Trifluralin
TRI	Triadimefon	Triadimefon
UE	Unión Europea	European Union
UPLC	Cromatografía de líquidos de ultra-alta eficacia	Ultra performance liquid chromatography
VP	N-Vinilpirrolidona	N-Vinylpirrolidone
WAX	Intercambiador aniónico débil de modo mixto	Mixed-mode weak anion exchange
WCX	Intercambiador catiónico débil de modo mixto	Mixed-mode weak cation exchange
WHO	Organización Mundial de la Salud	World Health Organization
α -END	α -Endosulfan	α -Endosulfan
β -END	β -Endosulfan	β -Endosulfan







ÍNDICE DE FIGURAS



Figura II.A.1: Estructura de los fungicidas estudiados en esta Tesis	13
Figura II.A.1 cont: Estructura de los fungicidas estudiados en esta Tesis	14
Figura II.A.2: Estructura de los insecticidas estudiados en esta Tesis.....	17
Figura II.A.3: Estructura del herbicida estudiado en esta Tesis	19
Figura II.A.4: Estructura de la Ocratoxina A	27
Figura II.A.5: Estructura de los estilbenos considerados en esta Tesis	31
Figura II.B.1: Esquema del proceso de SPE	39
Figura II.B.2: Esquema del proceso de DLLME	51
Figura II.B.3: Esquema del proceso de SPME	63
Figura II.C.1: Esquema del analizador de tipo cuadrupolar	70
Figura II.C.2: Esquema del analizador de trampa de iones (tipo QIT).....	71
Figura II.C.3: Esquema del analizador tiempo de vuelo	72
Figura II.C.4: Principio de MS/MS	74
Figura II.C.5: Esquema del espectrómetro de masas triple cuadrupolo	75
Figura II.C.6: Esquema del espectrómetro de masas cuadrupolo-tiempo de vuelo	76
Figura II.C.7: Esquemas de las fuentes API empleadas en LC-MS	85
Figura III.A.1: Esquema del proceso de extracción para la determinación de fungicidas en vino mediante DLLME y GC-MS	120
Figura III.A.2: Esquema del proceso de preparación de muestra para la determinación de estilbenos en vino mediante DLLME y GC-MS	121
Figura III.B.1: Esquema de los procedimientos seguidos para la determinación de neonicotinoides en vino mediante SPE y LC-MS/MS	152
Figura III.B.2: Esquema de preparación de muestra seguido para la determinación de OTA en vino mediante SPE y LC-QTOF-MS	153
Figura III.B.3: Esquema seguido para la determinación de estilbenos en vino mediante SPE y LC-QTOF-MS.....	155
Figura III.B.4: Esquema del procedimiento para la determinación multianalito de compuestos relacionados con la calidad del vino	156
Figura IV.A.1: Esquema del estudio de transformación de TR, DIF y FEN utilizando siliconas como soporte.....	224

Figura IV.A.2: Esquema del estudio de transformación de CYP en agua de río en presencia de nitrato226

Figura IV.A.3: Esquema del estudio de estabilidad de *t*-RESV en disolución hidroalcohólica227

Figura IV.B.1: Esquema del estudio de estabilidad de fungicidas en presencia de cloro287





ÍNDICE DE TABLAS



Tabla II.A.1: Propiedades físico-químicas de los fungicidas seleccionados recogidas en la base de datos <i>SciFinder</i>	15
Tabla II.A.2: Propiedades físico-químicas de los insecticidas seleccionados recogidas en la base de datos <i>SciFinder</i>	18
Tabla II.A.3: Propiedades físico-químicas del herbicida seleccionado recogidas en la base de datos <i>SciFinder</i>	19
Tabla II.A.4: Reglamento que establece los MRL de pesticidas en uva y valores de MRL en uva y vino según la legislación italiana y suiza	23
Tabla II.A.5: Porcentajes de transferencia para diferentes pesticidas desde la uva al vino ..	25
Tabla II.A.6: Residuos de pesticidas en vino	25
Tabla II.A.7: Hongos y micotoxinas de importancia mundial	26
Tabla II.A.8: Propiedades físico-químicas de la Ocratoxina A recogidas en la base de datos <i>SciFinder</i>	27
Tabla II.A.9: Niveles de OTA en vino	29
Tabla II.A.10: Propiedades físico-químicas de los estilbenos seleccionados recogidas en la base de datos <i>SciFinder</i>	31
Tabla II.A.11: Niveles de estilbenos en vino	34
Tabla II.B.1: Sílices enlazadas de fase normal, fase reversa e intercambio iónico comunes en SPE	43
Tabla II.B.2: Aplicaciones de SPE a la determinación de pesticidas en vino	47
Tabla II.B.3: Aplicaciones de SPE a la determinación de OTA en vino	48
Tabla II.B.4: Aplicaciones de SPE a la determinación de estilbenos en vino	49
Tabla II.B.5: Modalidades de DLLME descritas en la bibliografía	53
Tabla II.B.6: Propiedades de los agentes extractantes más utilizados en DLLME	55
Tabla II.B.7: Aplicaciones de DLLME a la determinación de pesticidas y estilbenos en vino ..	58
Tabla II.B.8: Aplicaciones de la combinación de SPE y DLLME a la determinación de pesticidas	60
Tabla II.C.1: Aplicaciones de GC-MS para la determinación de pesticidas y estilbenos	82
Tabla II.C.2: Aplicaciones de LC-MS para la determinación de pesticidas, estilbenos y OTA en vino	86





ANEXO:

OTRAS PUBLICACIONES



**DISPERSIVE LIQUID-LIQUID MICROEXTRACTION WITH
NON-HALOGENATED EXTRACTANTS FOR TRIHALOMETHANES
DETERMINATION IN TAP AND SWIMMING POOL WATER**

T. Rodríguez-Cabo, M. Ramil, I. Rodríguez, R. Cela

Talanta 99 (2012) 846-852

doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2012.07.041>

UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA



**TIME-OF-FLIGHT ACCURATE MASS SPECTROMETRY IDENTIFICATION OF
QUINOLINE ALKALOIDS IN HONEY**

T. Rodríguez-Cabo, M. Moniruzzaman, I. Rodríguez, M. Ramil, R. Cela, S.H. Gan

Analytical and Bioanalytical Chemistry 407 (2015) 6159-6170

doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-015-8791-2>





**EVALUATION OF THE AQUEOUS PHOTOTRANSFORMATION ROUTES OF
PHENYL ETHYL AZOLIC FUNGICIDES BY LIQUID CHROMATOGRAPHY
ACCURATE MASS SPECTROMETRY**

T. Rodríguez-Cabo, I. Rodríguez, M. Ramil R. Cela

Science of the Total Environment 615 (2018) 942-954

doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.003>

UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA



**ASSESSMENT OF ALCOHOLIC DISTILLATES FOR THE EXTRACTION OF
BIOACTIVE POLYPHENOLS FROM GRAPEVINE CANES**

T. Rodríguez-Cabo, I. Rodríguez, M. Ramil, R. Cela

Industrial Crops and Products 111 (2018) 99-106

doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.10.011>

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA





