

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

FACULTAD DE QUÍMICA

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología



Desarrollo de nuevas metodologías analíticas basadas en la espectrometría de masas en tándem para la determinación de residuos de plaguicidas en productos de origen animal y compartimentos medioambientales relacionados.

Beca FPI del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA)

Trabajo desarrollado en el Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo (INGACAL-CIAM)

María García Chao

Memoria para optar al grado de Doctora en Química

Mayo de 2010, Santiago de Compostela.

D. Thierry Dagnac, Investigador del Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo-INGACAL, Xunta de Galicia, y **Dña. María Llopart Vizoso**, Profesora Titular del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Santiago de Compostela,

Autorizan:

A la Licenciada **Dña. María García Chao** a la presentación del trabajo titulado **“DESARROLLO DE NUEVAS METODOLOGÍAS ANALÍTICAS BASADAS EN LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM PARA LA DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS EN PRODUCTOS DE ORIGEN ANIMAL Y COMPARTIMENTOS MEDIOAMBIENTALES RELACIONADOS”** que ha realizado bajo nuestra dirección en el Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo, para optar al grado de Doctora en Química.

Y para que así conste, firmamos la presente autorización en Santiago de Compostela, a día 28 de Mayo de 2010.

D. Thierry Dagnac

Dña. María Llopart Vizoso

AGRADECIMIENTOS

Ahora que llego al final de esta primera etapa de mi corta pero intensa vida científica, echando la mirada atrás me doy cuenta de que el tiempo pasa mucho más que rápido y que en estos años habéis sido muchos los que habéis compartido conmigo momentos importantes dentro y fuera del laboratorio.

No puedo negar que ha habido momentos duros (¿quién no los tiene?), sobre todo hacia el final, pero incluso esos, ahora más que nunca, me hacen reír y sonreír siguiendo fielmente una gran frase que un día me dijo una buena amiga: “lo que hoy es sufrimiento, mañana será anécdota”. No quiero olvidarme a nadie pero tampoco me gustaría empezar con una lista interminable de nombres y razones, por lo que voy a intentar ser más bien escueta en mis agradecimientos (aunque conociéndome, lo veo difícil).

En primer lugar me gustaría dar las gracias a mis directores, **Thierry** y **María** por su dedicación plena. Ha sido un verdadero placer compartir estos años con vosotros, trabajar codo con codo con Thierry, y aprender todo lo que ahora, pasados cuatro años, me doy cuenta que sé. Y lo que es más importante, gracias por hacer que aun siga queriendo aprender más y más. Si algo no me ha faltado ha sido apoyo y motivación y ha sido, en gran parte, gracias a vosotros. Creo sin ninguna duda que soy realmente afortunada por haber tenido la oportunidad de hacer esto a vuestro lado; de corazón, gracias.

En segundo lugar, agradecer al **INIA** (Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria) la beca predoctoral que me ha otorgado, sin la cual esto nunca hubiera sido posible; además me ha permitido asistir a cursos, participar en congresos internacionales y realizar estancias en el extranjero, gracias a lo cual mi formación ha sido mucho más valiosa. En especial, agradecer a **Julián Barrera** todo su tiempo y su eficiencia como Jefe del Servicio de Seguimiento y Control de la Promoción Científica. No puedo ni quiero dejar de mencionar al **CIAM** (Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo) que me ha brindado las condiciones materiales necesarias para realizar mi trabajo día a día. Querría también agradecer especialmente a **Triantafyllos Albanis** el hacer posible la realización una estancia en la Universidad de Ioannina trabajando en el Laboratorio de Tecnología Medioambiental bajo su dirección y brindarme de esta forma la oportunidad de conocer esa zona tan maravillosa en un país tan lleno de sorpresas como es Grecia.

A Thermo Fisher Scientific, gracias por la ayuda para imprimir estos ejemplares y por supuesto a **Irma** por un trabajo mucho más que bien hecho (no por esto, sino en general).

La Memoria de Tesis que presento es el resultado de un trabajo en equipo; por eso, además de a mis directores, me gustaría dar las gracias especialmente a **Paula** y a **Chus**,

mis dos manos izquierdas en el laboratorio, por toda la ayuda durante el tiempo que trabajamos juntas. A Paula, gracias por las risas, los días de trabajo duro y los que no, por las ganas de trabajar, y por supuesto por las broncas y por los ánimos. A Chus, gracias por el esfuerzo para coger el ritmo vertiginoso del laboratorio (¡y el mío!). Sin vosotras, sin duda, esto no hubiera sido lo mismo. Igualmente, gracias a **María** y **Pablo** que desde Santiago me han ayudado cuando lo he necesitado, También a **Marifuz** y **Moisés**: muchas gracias por todas las veces que me habéis ayudado a salir del lío!!!. Agradecer su trabajo a toda la gente que ha participado en los proyectos de investigación por su colaboración con los muestreos, las encuestas, y otras labores sin las cuales mi trabajo sería imposible, en especial a **Bruno**, **Pura** y **Juan**.

En cuanto al resto de compañeros cada risa cuenta, así que a vosotros también agradeceremos que la jornada laboral haya sido tan sumamente llevadera. En especial **Sonia**, **Paula**, **Belén**, **Mira** (te he echado tanto de menos...), y por supuesto **Alí** y **Laura**: ha sido un verdadero placer hacer vida cada día con vosotras; **Ana** ¿que puedo decir de ti?... Pues que me ha encantado tenerte de “compañeira”.

Ευχαριστώ para la parte helena; **Ntina**, **Gianis**, **Vasilis** y **Ashar**, que se hicieron cargo de mi laboral y personalmente en Ioannina, y **Apóstolo**, **Antonis** y **Anna** (ελπίζω να σας ξαναδώ πολύ σύντομα)

Ya para finalizar quedan dos paradas obligadas: **mi familia** y “**mis bases**”. Para los primeros no hay palabras, podría agradecerles... vaya, ¡todo! Desde luego muchas gracias por la paciencia, apoyo, ánimos y consejos.

A mis amigos, a los de siempre: **Breixo**, **Torres**, **Villí**, **Marcos**, **Tamara**, **Reme**, **Ana**... Gracias por todo... ¿que os voy a decir que no esté dicho a estas alturas? **Idoia**, gracias en especial por una conversación telefónica en un día clave. A mis bases coruñesas: gracias por todas las risas, los dúplo-rayos (ese **Tomás**!) y las desconexiones, en especial a **Luis** y **Ana** porque no habéis parado de preocuparos por mí; y **Santi**... amigo... gracias por todo.

Resumiendo, gracias a todos los que os habéis parado conmigo, a los que en algún momento me habéis ayudado, en lo personal y profesional, a todos mis amigos, a todos mis compañeros y a todos los que en algún momento me han hecho disfrutar de un café en el Uní, unas tapas, un vino, un viaje o un engorroso día de tamizado de muestra (por poner un ejemplo).

A todos, GRACIAS

(de verdad, de la buena, de corazón)

En el fondo, los científicos somos gente con suerte: podemos jugar a lo que queremos durante toda la vida.

Lee Smolin

ÍNDICE

ÍNDICE GENERAL

ABSTRACT	1
CAPÍTULO I – INTRODUCCIÓN	7
<i>I.A. LOS PRODUCTOS FITOSANITARIOS</i>	9
1. Antecedentes	- 12 -
2. Composición de productos comerciales de acción fitosanitaria	- 14 -
3. Clasificación	- 15 -
3.1. Según su función	- 15 -
3.2. Según la composición química del principio activo	- 16 -
3.3. Según su toxicidad y peligrosidad	- 17 -
3.4. En función del modo de actuación.....	- 18 -
3.5. En función del momento de aplicación.....	- 18 -
4. Problemática que genera el uso de pesticidas	- 19 -
4.1. Efectos sobre plagas y otros organismos.....	- 19 -
4.2. Bioacumulación y biomagnificación	- 19 -
4.3. Riesgos para la salud humana	- 20 -
5. Contaminación medioambiental	- 20 -
5.1. Contaminación difusa	- 25 -
6. Evolución y desarrollo del mercado de pesticidas	- 25 -
7. Disposiciones legales relativas a plaguicidas	- 27 -
7.1. Regulaciones del comercio de plaguicidas en la Unión Europea	- 27 -
7.2. Regulaciones en la aplicación de pesticidas y en la presencia de residuos.	- 28 -
8. Pesticidas estudiados en esta Tesis.	- 37 -

9. Bibliografía - 39 -

***I.B. DISPOSITIVOS DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN
UTILIZADOS*** **45**

1. Cromatógrafo de gases GC-MS/MS. Polaris Q..... - 46 -
2. Cromatógrafo de líquidos - 48 -
 2.1. Detector de espectrometría de masas de triple cuadrupolo TSQ Quantum..... - 49 -
 2.2. Modos de detección que permite el Quantum Access - 53 -
3. Bibliografía - 56 -

I.C. QUIMIOMETRÍA **57**

1. Diseño experimental - 58 -
 1.1. Introducción - 59 -
 1.2. Optimización de resultados - 59 -
2. Bibliografía - 63 -

I.D. TÉCNICAS DE PREPARACIÓN DE MUESTRA **65**

1. Extracción asistida por ultrasonidos (UAE) - 68 -
 1.1. Factores que afectan al proceso de extracción - 68 -
2. Extracción asistida por microondas (MAE) - 69 -
 2.1. Factores que afectan al proceso de extracción - 69 -
3. Extracción en fase sólida (SPE) - 71 -
 3.1. Procedimiento - 72 -
 3.2. Dispositivos - 73 -
 3.3. Factores que afectan al proceso de SPE..... - 75 -
 3.4. Ventajas y limitaciones de la técnica..... - 77 -
4. Dispersión de matriz en fase sólida (MSPD) - 77 -

4.1. Procedimiento.....	- 78 -
4.2. Factores que afectan al proceso de MSPD.....	- 79 -
4.3. Ventajas y limitaciones de la técnica.....	- 82 -
5. DSPE (QuEChERS).....	- 83 -
5.1. Introducción a la técnica.....	- 83 -
5.2. Procedimiento.....	- 84 -
5.3. Factores que afectan al proceso de extracción.....	- 86 -
5.4. Consideraciones prácticas.....	- 89 -
5.5. Aplicaciones de métodos QuEChERS.....	- 89 -
6. Bibliografía.	- 91 -

CAPÍTULO II – JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS **97**

CAPÍTULO III – PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL **103**

1. Patrones	- 106 -
2. Reactivos, gases y disolventes	- 109 -
2.1. Disolventes.....	- 109 -
2.2. Gases.....	- 109 -
2.3. Reactivos.....	- 110 -
3. Instrumental	- 110 -
3.1. Agitación y separación.....	- 110 -
3.2. Balanzas.....	- 111 -
3.3. Material de uso general en el laboratorio	- 111 -
3.4 material específico para SPE y MSPD.....	- 112 -
3.5. Medidas de volumen.....	- 112 -

3.6. Refrigeración y secado.....	- 112 -
3.7. Materiales y sistemas de extracción.....	- 113 -
3.8. Equipo de concentración y separación.....	- 113 -
3.9. Viales.....	- 113 -
3.10. Muestreo y almacenamiento de las muestras.....	- 113 -
4. Preparación de las soluciones de trabajo.....	- 114 -
4.1. Disoluciones stock, patrones de calibrado y mezclas de fortificación.....	- 114 -
4.2. Preparación de fases móviles.....	- 115 -
5. Acondicionamiento y limpieza del material.....	- 116 -
5.1. Protocolos de limpieza.....	- 116 -
5.2. Acondicionamiento de reactivos.....	- 117 -
6. Gestión de residuos.....	- 117 -

CAPÍTULO IV – DISCUSIÓN Y RESULTADOS **119**

IV.A. DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE PESTICIDAS EN LECHE DE VACA. ***121***

1. Parte experimental.....	- 126 -
1.1. Patrones empleados. Preparación de disoluciones.....	- 126 -
1.2. Toma de muestra.....	- 127 -
1.3. Procedimientos de extracción utilizados.....	- 128 -
1.4. Detección y cuantificación.....	- 131 -
2. Discusión de resultados.....	- 132 -
2.1. Optimización de las condiciones cromatográficas.....	- 132 -
2.2. Pruebas previas.....	- 134 -
2.3. Parámetros de calidad del método.....	- 148 -
2.4. Aplicación al estudio de muestras recogidas en explotaciones gallegas.....	- 153 -

2.5. Evaluación de la distribución de pesticidas en la leche.....	- 155 -
3. Trabajos relacionados con la investigación desarrollada.	- 161 -
4. Bibliografía.	- 162 -

IV.B. DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE PESTICIDAS EN MIEL Y POLEN

165

1. Parte experimental.....	- 169 -
1.1. Patrones empleados. Preparación de disoluciones.	- 169 -
1.2. Toma de muestra.....	- 170 -
1.3. Procedimiento de extracción utilizado.....	- 171 -
1.4. Detección y cuantificación.	- 173 -
2. Discusión de resultados	- 174 -
2.1. Optimización de las condiciones cromatográficas	- 174 -
2.2. Pruebas previas	- 184 -
2.3. Parámetros de calidad del método.....	- 192 -
2.4. Aplicación al estudio de muestras de miel de apiarios de Galicia	- 200 -
3. Bibliografía	- 206 -

IV.C. DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE PESTICIDAS EN MUESTRAS DE AGUA DE RÍO

211

1. Parte experimental.....	- 215 -
1.1. Patrones empleados. Preparación de disoluciones.	- 215 -
1.2. Descripción de las áreas y frecuencias de muestreo.....	- 216 -
1.3. Procedimiento de extracción: SPE.	- 218 -
1.4. Detección y cuantificación.	- 220 -
2. Discusión de resultados.	- 222 -
2.1. Optimización de las condiciones cromatográficas.	- 222 -

2.2. Pruebas previas.....	- 226 -
2.3. Parámetros de calidad del método.....	- 228 -
2.4. Análisis cuantitativo de los resultados en aguas superficiales.....	- 234 -
2.5. Evaluación de la información derivada del estudio.	- 249 -
3. Bibliografía.	- 251 -

IV.D. DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE PESTICIDAS EN MUESTRAS DE SUELO AGRÍCOLA **255**

1. Parte experimental.	- 258 -
1.1. Patrones empleados. Preparación de disoluciones.....	- 258 -
1.2. Descripción de las áreas muestreadas y del tratamiento de muestra.	- 259 -
1.4. Detección y cuantificación.....	- 261 -
2. Discusión de resultados.....	- 263 -
2.1. Optimización de las condiciones cromatográficas.....	- 263 -
2.2. Condiciones de la extracción asistida por microondas.....	- 264 -
2.3. Planteamiento del estudio.....	- 265 -
2.4. Determinación del porcentaje de recuperación de los pesticidas en los suelos agrícolas.....	- 266 -
2.5. Estimación de los límites de detección y cuantificación.	- 271 -
2.6. Influencia del contenido de materia orgánica sobre las respuestas analíticas de los compuestos por GC-MS/MS.	- 272 -
2.7. Determinación de residuos de pesticidas en las 36 muestras de suelo recogidas en el periodo de pre-siembra.....	- 275 -
3. Bibliografía.	- 279 -

IV.E. ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS PRESTACIONES DEL EQUIPO EN MODO SRM Y SRM+QED **281**

1. Planteamiento del estudio.	- 283 -
---	----------------

2. Condiciones cromatográficas.....	- 284 -
3. Discusión de resultados.	- 285 -

CAPÍTULO V – CONCLUSIONES (CONCLUSIONS)	291
--	------------

CAPÍTULO VI – ANEXOS	309
-----------------------------	------------

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO I – INTRODUCCIÓN	7
<i>I.A. LOS PRODUCTOS FITOSANITARIOS</i>	9
Figura I.A.1. Pintura que ilustra el uso de pesticidas en la antigüedad.	12 -
Figura I.A.2. Factores que condicionan la disponibilidad de un pesticida en el medio.....	21 -
Figura I.A.3. Ilustración esquemática de la movilidad de pesticidas en el medioambiente	22 -
Figura I.A.4. Ventas de pesticidas industriales durante el período de 1990 al 2005 a nivel mundial.....	26 -
Figura I.A.5. Consumo de pesticidas a nivel mundial	26 -
<i>I.B. DISPOSITIVOS DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN UTILIZADOS</i>	45
Figura I.B.1. Esquema de la trampa de iones	47 -
Figura I.B.2 Cromatógrafo de líquidos.....	48 -
Figura I.B.3 Fuente de ionización	49 -
Figura I.B.4 Esquema del funcionamiento de la fuente de ionización H-ESI	50 -
Figura I.B.5 Esquema del analizador de triple cuadrupolo.....	52 -
<i>I.C. QUIMIOMETRÍA</i>	57
Figura I.C.1 Dominio experimental para un diseño Doehlert de dos factores	61 -
Figura I.C.2. Desplazamiento del dominio experimental	61 -
<i>I.D. TÉCNICAS DE PREPARACIÓN DE MUESTRA</i>	65
Figura I.D.1. Esquema del procedimiento de SPE como método de extracción	73 -

Figura I.D.2. Algunos dispositivos de SPE comercializados actualmente.....	- 74 -
Figura I.D.3. Procedimiento general de una extracción por MSPD.....	- 79 -
Figura I.D.4. Procedimiento desarrollado por Anastassiades et al.	- 85 -

CAPÍTULO IV – DISCUSIÓN Y RESULTADOS **119**

IV.A. DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE PESTICIDAS EN LECHE DE VACA **121**

Figura IV.A.1. Procedimiento de extracción de leche por SPE.....	- 129 -
Figura IV.A.2. Procedimiento de extracción de leche por DSPE.....	- 130 -
Figura IV.A.3. Superficies de respuesta obtenidas con el diseño experimental de Doehlert.....	- 137 -
Figura IV.A.4. Recuperación de los compuestos extraídos mediante DSPE con acetonitrilo o metanol utilizando C18 como mezcla dispersante.....	- 140 -
Figura IV.A.5. Recuperación de los compuestos extraídos mediante DSPE con acetonitrilo o metanol utilizando CGB como mezcla dispersante.....	- 141 -
Figura IV.A.6. Gráficas de comparación de las recuperaciones calculadas para extractos de DSPE de leche, realizados con C18 y CGB.....	- 142 -
Figura IV.A.7. Cromatogramas obtenidos tras el análisis con el LC-MS/MS de 5 µl de un extracto de leche cruda preparado con la metodología propuesta.....	- 144 -
Figura IV.A.8. Efecto de la congelación sobre la señal para 6 de los compuestos estudiados.....	- 146 -
Figura IV.A.9 Cromatograma obtenido para 4 de las muestras de leche analizadas.....	- 154 -
Figura IV.A.10. Separación de una muestra de leche cruda en dos fases.	- 156 -

IV.B. DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE PESTICIDAS EN MIEL Y POLEN **165**

Figura IV.B.3. Procedimiento de extracción de miel por SPE.....	- 172 -
---	---------

Figura IV.B.4. Superposición de dos cromatogramas en TIC, obtenidos tras el análisis de dos patrones de igual concentración preparados en fase móvil y en metanol.....	176 -
Figura IV.B.5. Recuperaciones calculadas para un patrón de concentración 30 ng mL ⁻¹ de todos los compuestos preparados en metanol y en fase móvil	177 -
Figura IV.B.6. TIC de un patrón de 30 ng mL ⁻¹ obtenido a partir de una misma adquisición con dos segmentos de distintas polaridades	178 -
Figura IV.B.7. Cromatograma de un patrón de concentración de 50 ng g ⁻¹ para imidacloprid y 10 ng g ⁻¹ para el resto de analitos.....	179 -
Figura IV.B.8. Señales cromatográficas y espectro de masas (SRM) obtenidos al adquirir las transiciones optimizadas para fipronil carboxamida.....	180 -
Figura IV.B.9. Señales cromatográficas y espectro de masas (SRM) obtenidos tras el análisis de un patrón de fipronil sulfona de concentración 30 ng mL ⁻¹	181 -
Figura IV.B.10. Fragmentación propuesta para fipronil carboxamida y fipronil sulfona.	182 -
Figura IV.B.11. Fragmentación propuesta para el fipronil sulfona con un ³⁷ Cl.	183 -
Figura IV.B.12. Compuestos asignados a las picos adquiridos para las transiciones optimizadas de fipronil carboxamida.....	183 -
Figura IV.B.13. Recuperaciones normalizadas para extractos obtenidos a partir de una muestra de panal centrifugado, extraído con distintos tipos de cartuchos y de eluyentes.....	184 -
Figura IV.B.14. Variación de las recuperaciones obtenidas en función de la cantidad de muestra extraída.....	186 -
Figura IV.B.15. Superficies de respuesta para fipronil e imidacloprid obtenidas a partir del diseño experimental de Doehlert.....	188 -
Figura IV.B.16. Rectas de adición de matriz y de calibrado para los compuestos que tienen LMR establecido.	190 -
Figura IV.B.17. Cromatograma de un nivel de calibrado de la recta de adición (50 ng mL ⁻¹ para imidacloprid y 10 ng mL ⁻¹ para el resto) con ampliación de espectro de dos transiciones SRM de dos transiciones de dos señales.....	191 -
Figura IV.B.18. Esquema seguido para el cálculo de recuperación, reproducibilidad y repetibilidad a partir de los 27 extractos.....	193 -
Figura IV.B.19. Gráficas de dispersión de residual estandarizado y corrección de outliers. -	194 -
Figura IV.B.20. Rectas de calibrado obtenidas para los compuestos estudiados.....	196 -

Figura IV.B.21. Deducción del cálculo de $CC\alpha$	- 199 -
Figura IV.B.22. Cinco muestras representativas de las recibidas en el laboratorio	- 201 -
Figura IV.B.23. Procedimiento de separación de la fracción “extraíble”.	- 202 -
Figura IV.B.24. Cromatograma obtenido para un blanco de fase móvil y cinco muestras recibidas en el laboratorio, extraídas según el protocolo descrito y validado.	- 203 -
Figura IV.B.25. Comparación de los espectros de SRM correspondientes a la interferencia de la fase móvil y del fipronil sulfona para la SRM de este compuesto.....	- 204 -

IV.C. DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE PESTICIDAS EN MUESTRAS DE AGUA DE RÍO

211

Figura IV.C.1. Mapeado del muestreo en las cuencas del alto Miño (izquierda) y Xallas (derecha).....	- 217 -
Figura IV.C.2. Correlación entre densidad de ganado y proporción de maíz cultivado por subcuenca para la cuenca del Xallas	- 218 -
Figura IV.C.3. Procedimiento de extracción de muestras de agua de río por SPE.....	- 220 -
Figura IV.C.4. Cromatogramas obtenidos tras el análisis cromatográfico con el LC-MS/MS de 10 μ l de un extracto de agua superficial fortificada a una concentración de 100 μ g mL ⁻¹	- 226 -
Figura IV.C.5. Recuperaciones obtenidas con los dos cartuchos Oasis TM HLB para algunos de los compuestos.	- 228 -
Figura IV.C.6. Gráficos de comparación de las recuperaciones obtenidas con ambos niveles de concentración.....	- 231 -
Figura IV.C.7. Evolución de las concentraciones determinadas para acetocloro, alacloro, atrazina y terbutilazina en los 15 puntos de muestreo de la cuenca del Xallas durante los dos años de estudio.....	- 238 -
Figura IV.C.8. Cromatograma en TIC y reconstituido en base a las transiciones SRM de atrazina, alacloro, acetocloro y terbutilazina para la subcuenca C09 del muestreo de junio de 2007 para la cuenca del río Xallas.....	- 239 -
Figura IV.C.9. Evolución de la concentración total de pesticidas determinada para cada una de las subcuencas del río Xallas.....	- 240 -

Figura IV.C.10. Evolución de las concentraciones determinadas para acetocloro, alacloro, atrazina y terbutilazina en los 8 puntos de muestreo en la cuenca del alto Miño durante los dos años de estudio.- 243 -

Figura IV.C.11. Concentración total de pesticidas determinada para cada una de las subcuencas del río Miño.- 244 -

Figura IV.C.12. Media anual de concentraciones determinadas para la cuenca del río Xallas.- 246 -

Figura IV.C.13. Media anual de concentraciones determinadas para la cuenca del alto Miño.- 247 -

Figura IV.C.14. Media anual de concentraciones determinadas para la suma de las sustancias prioritarias detectadas en ambas cuencas para los dos años de muestreo.....- 249 -

IV.D. DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE PESTICIDAS EN MUESTRAS DE SUELO AGRÍCOLA ***255***

Figura IV.D.1. Descripción del muestreo- 259 -

Figura IV.D.2. Recuperaciones obtenidas para las acetanilidas en cada una de las submuestras de las 3 parcelas analizadas.....- 267 -

Figura IV.D.3. Recuperaciones obtenidas para los piretroides en cada una de las submuestras de las 3 parcelas analizadas.- 268 -

Figura IV.D.4. Recuperaciones obtenidas para las triazinas en cada una de las submuestras de las 3 parcelas analizadas.....- 269 -

Figura IV.D.5. Recuperaciones obtenidas para los organofosforados en cada una de las submuestras de las 3 parcelas analizadas.....- 270 -

Figura IV.D.6. Gráficas de efecto matriz registrado para cada una de las submuestras en función de su % de materia orgánica y de la textura de la parcela muestreada.- 273 -

Figura IV.D.7. Cromatogramas de la muestra correspondiente al horizonte A de la parcela 3 para aquellos compuestos que estuvieron presentes en la muestra.....- 278 -

IV.E. ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS PRESTACIONES DEL EQUIPO EN MODO SRM Y SRM+QED ***281***

- Figura IV.E.1. Cromatograma en TIC y espectros de MS² obtenidos para la adquisición en modo SRM+QED para un patrón de 10 ng mL⁻¹ preparado en metanol..... - 283 -
- Figura IV.E.2. Puntos determinados por pico cromatográfico para 4 compuestos en función del tiempo de escaneo y del número de transiciones adquiridas..... - 286 -
- Figura IV.E.3. Cromatogramas obtenidos para dos patrones de 10 ng mL⁻¹ determinando 138 transiciones con un tiempo de escaneo de 5 milisegundos en modo SRM y SRM+QED..... - 288 -

ÍNDICE DE TABLAS

CAPÍTULO I – INTRODUCCIÓN **7**

I.A. LOS PRODUCTOS FITOSANITARIOS **9**

Tabla I.A.1. Evolución en la aplicación de pesticidas a lo largo de la historia.....	- 13 -
Tabla I.A.2. Clasificación de agroquímicos según el tipo de plaga que controlan.	- 15 -
Tabla I.A.3. Clasificación de pesticidas según la familia química de su principio activo	- 16 -
Tabla I.A.4. Clasificación de pesticidas según la toxicidad.....	- 17 -
Tabla I.A.5. Clasificación de pesticidas en función del modo de actuación sobre la plaga.	- 18 -
Tabla I.A.6. Clasificación de fitosanitarios en función del modo de aplicación sobre el cultivo.....	- 18 -
Tabla I.A.7. Efectos de los fitosanitarios sobre el medioambiente.....	- 24 -
Tabla I.A.8. LMR en ng g ⁻¹ (ppb) establecidos en la Directiva 96/23/CE para los pesticidas analizados en esta Memoria	- 31 -
Tabla I.A.9. Normas de calidad ambiental establecidas para los 10 pesticidas legislados.....	- 35 -
Tabla I.A.10. Pesticidas estudiados por matriz.....	- 37 -

I.D. TÉCNICAS DE PREPARACIÓN DE MUESTRA **65**

Tabla I.D.1. Metodologías de extracción y limpieza de extractos utilizadas.....	- 68 -
---	--------

CAPÍTULO III – PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL **103**

Tabla III.1. Relación de los estándares individuales y las mezclas técnicas utilizadas.	- 106 -
Tabla III.2. Composición de las mezclas de compuestos.....	- 108 -

CAPÍTULO IV – DISCUSIÓN Y RESULTADOS **119**

IV.A. DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE PESTICIDAS EN LECHE DE VACA.

121

Tabla IV.A.1. Compuestos determinados en leche cruda.	126 -
Tabla IV.A.2. Condiciones cromatográficas empleadas para la detección de los analitos. ...	131 -
Tabla IV.A.3. Transiciones SRM y energías de colisión para la detección y cuantificación de los pesticidas estudiados	133 -
Tabla IV.A.4. Variables estudiadas con el diseño experimental.	135 -
Tabla IV.A.5. Matriz de experiencias del diseño.	135 -
Tabla IV.A.6. Condiciones del proceso de extracción por SPE.	137 -
Tabla IV.A.7. Condiciones de compromiso para realizar la DSPE de los 44 analitos.....	143 -
Tabla IV.A.9. Estimación del % de supresión (-) o aumento (+) de señal en LC-MS/MS.-	147 -
Tabla IV.A.10. Precisión y exactitud del método analítico propuesto.	149 -
Tabla IV.A.11. Límites de detección y cuantificación en muestra y residuo seco “no graso” de leche.....	151 -
Tabla IV.A.12. Proporción de compuesto que migra a la fracción lipídica de la leche cruda.....	160 -

IV.B. DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE PESTICIDAS EN MIEL Y POLEN

165

Tabla IV.B.1. Condiciones cromatográficas y del detector MS/MS empleadas para la determinación de los analitos.	173 -
Tabla IV.B.2. Transiciones SRM y energías de colisión optimizadas para la detección y cuantificación de los pesticidas estudiados.....	175 -
Tabla IV.B.3. Tercera transición SRM para cuatro de los compuestos estudiados.....	175 -
Tabla IV.B.4. Variables estudiadas con el diseño experimental.	187 -
Tabla IV.B.5. Matriz de experiencias del diseño experimental.....	187 -
Tabla IV.B.6. Recuperaciones obtenidas para las experiencias del diseño.	188 -
Tabla IV.B.7. Condiciones de compromiso para la extracción de los 7 compuestos.	189 -

Tabla IV.B.8. Comparación de las pendientes de la recta de calibrado y de adición y estimación del % de supresión (-) o aumento (+) de señal para los compuestos estudiados.	189 -
Tabla IV.B.9. Valores de recuperación media y para cada nivel de fortificación.	197 -
Tabla IV.B.10. Estimación de la precisión del método analítico propuesto.	198 -
Tabla IV.B.11. Valores de límite de decisión y capacidad de detección.	200 -

IV.C. DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE PESTICIDAS EN MUESTRAS DE AGUA DE RÍO ***211***

Tabla IV.C.1. Compuestos determinados en las cuencas del río Xallas y del río Miño.	216 -
Tabla IV.C.2. Condiciones cromatográficas empleadas para la separación y detección de los analitos.	222 -
Tabla IV.C.3. Transiciones SRM y energías de colisión para la detección y cuantificación de los pesticidas estudiados.	223 -
Tabla IV.C.4. Valores calculados de límites de detección y cuantificación.	232 -

IV.D. DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE PESTICIDAS EN MUESTRAS DE SUELO AGRÍCOLA ***255***

Tabla IV.D.1. Compuestos determinados en suelos agrícolas.	258 -
Tabla IV.D.2. Condiciones cromatográficas empleadas para la detección de los analitos. ...	261 -
Tabla IV.D.3. Parámetros evaluados en la puesta a punto del método de extracción asistida por microondas.	264 -
Tabla IV.D.4. Condiciones de extracción de los analitos en muestras de tierra.	264 -
Tabla IV.D.5. Caracterización de cada uno de los suelos por textura y materia orgánica evaluada para los horizontes de cada suelo.	265 -
Tabla IV.D.6. LODs y LOQs establecidos para los 28 compuestos estudiados.	271 -
Tabla IV.D.7. Concentraciones calculadas para las 12 parcelas por cada uno de los horizontes (HA, HB y HC, de menor a mayor profundidad).	275 -

IV.E. ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS PRESTACIONES DEL EQUIPO EN MODO SRM Y SRM+QED **281**

Tabla IV.E.1. Condiciones cromatográficas empleadas para la separación y detección de los analitos..... - 284 -

Tabla IV.E.2. Ecuaciones y coeficiente de regresión para atrazina (1), clorfenvinfós (2), metil pirimifós (3), metolaclor (4), prometrina (5) y terbutrina (6)..... - 287 -

Tabla IV.E.3. Resultados obtenidos para SRM y SRM+QED. - 289 -

ABSTRACT

Nowadays, the agricultural activities need the use of agrochemicals to protect crops and assure a good production. The widespread use of these chemicals “tools” may cause the contamination of the different environmental compartments with some pesticides which are, in most cases, extremely hazardous to the health of humans and non-target animals or plants. For this reason, the impact derived from the use of pesticides in the agricultural field and in the final products is a subject of major concern.

Complying with the current situation, the present work has been developed around two basic axes: **food safety** and **environmental contamination**.

As regards the first one, one of the goals was the **development of analytical methods** for the determination of **pesticides in animal products (milk and honey)**. Since last years, the European Union has established new regulations related to the maximum residue level (LMR) of pesticides in different animal commodities, as well as some regulations related to the sampling procedure in the case of milk and honey. Some specifications for the development of the analytical methodology were also laid down. Trying to comply with these legal specifications, a new fast and easy methodology for milk analysis is proposed in this Thesis, and a novel methodology for the sample pretreatment in the case of the hive samples.

The research in the field of environmental contamination focuses on **environmental matrices (soils and water)** related to agricultural and farming activities. The study was performed in surface water and agricultural soils, both sampled in the same area. The main purpose was to provide a first assessment of the quality of the surface water in two river basins located in NW Spain. The contamination of the agricultural soils that received directly the pesticides was also evaluated. In this sense, it could be possible to establish a profile of the amounts of pesticide residues as a function of the soil use and of the agronomic schedule. Other aim in this field was to evaluate the effect of the diffuse contamination of pesticides between related environmental compartments.

All the analytical methodologies have been developed on the basis of **advanced extraction techniques**, such as **MAE** (Microwave assisted extraction), **SPE** (Solid phase extraction), **MSPD** (Matrix solid phase dispersion) or **DSPE** (Dispersive solid phase extraction). These novel methods represent some clear advantages such as significant decreases in the extraction time and the organic solvent consumption, thereby leading to a reduction of the costs. It must be also pointed out that, in all the cases, it was possible to perform the simultaneous extraction of at least 12 samples and working with very low amounts of sample.

In the case of the methodologies related to the study the food safety, the extraction conditions were optimized using **chemometric tools**. In particular, Doehlert designs have been applied with a very low number of experiments in order to evaluate the most influential

factors in the extraction process, as well as the interactions between factors and to find the optimal conditions.

All the analytical measurements were performed with liquid chromatography coupled to a triple quadrupole mass spectrometer, or gas chromatography with tandem mass spectrometry.

As a result, four different multiresidue analytical methodologies are described in this Thesis, focussed on the study of many chemical families such as organophosphorus, triazines, phenylureas, pyrethroids, chloroacetanilides, phenylpyrazoles or neonicotinoids, meaning a total of 74 target compounds.

I. INTRODUCCIÓN



I.A. LOS PRODUCTOS FITOSANITARIOS

1. ANTECEDENTES.....	- 12 -
2. COMPOSICIÓN DE PRODUCTOS COMERCIALES DE ACCIÓN FITOSANITARIA	- 14 -
3. CLASIFICACIÓN.....	- 15 -
3.1. SEGÚN SU FUNCIÓN	- 15 -
3.2. SEGÚN LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL PRINCIPIO ACTIVO ...	- 16 -
3.3. SEGÚN SU TOXICIDAD Y PELIGROSIDAD	- 17 -
3.4. EN FUNCIÓN DEL MODO DE ACTUACIÓN.....	- 18 -
3.5. EN FUNCIÓN DEL MOMENTO DE APLICACIÓN.....	- 18 -
4. PROBLEMÁTICA QUE GENERA EL USO DE PESTICIDAS	- 19 -
4.1. EFECTOS SOBRE PLAGAS Y OTROS ORGANISMOS	- 19 -
4.2. BIOACUMULACIÓN Y BIOMAGNIFICACIÓN.....	- 19 -
4.3. RIESGOS PARA LA SALUD HUMANA	- 20 -
5. CONTAMINACIÓN MEDIOAMBIENTAL.....	- 20 -
5.1. CONTAMINACIÓN DIFUSA	- 25 -
6. EVOLUCIÓN Y DESARROLLO DEL MERCADO DE PESTICIDAS.....	- 25 -
7. DISPOSICIONES LEGALES RELATIVAS A PLAGUICIDAS.	- 27 -
7.1. REGULACIONES DEL COMERCIO DE PLAGUICIDAS EN LA UNIÓN EUROPEA.....	- 27 -
7.2. REGULACIONES EN LA APLICACIÓN DE PESTICIDAS Y EN LA PRESENCIA DE RESIDUOS.	- 28 -
7.2.1. Directiva Europea 96/23/CE.....	- 28 -
7.2.1.2. Límite máximo de residuos (LMRs).....	- 29 -

7.2.1.3. Desarrollo de metodologías analíticas en base a las restricciones legales.	- 30 -
7.2.2. Directiva Marco Sobre Aguas 2000/60/CE (DMA)	- 32 -
7.2.2.1. Sustancias prioritarias en aguas superficiales.....	- 33 -
7.2.1.3. Desarrollo de metodologías analíticas en base a la Directiva Marco Sobre Aguas.....	- 34 -
7.2.3. Estrategia Temática para la Protección del Suelo.....	- 35 -
8. PESTICIDAS ESTUDIADOS EN ESTA TESIS.	- 37 -
9. BIBLIOGRAFÍA.	- 39 -

Se conoce bajo el nombre de **pesticidas** a los productos (sustancias o ingredientes activos, así como las formulaciones o preparados) destinados a favorecer o regular la producción vegetal, conservar los productos vegetales, y a combatir, eliminar, controlar y prevenir las plagas que puedan afectar a cultivos agrícolas [1-3]. Éstas se definen a su vez como *cualquier especie, raza o biotipo vegetal o animal o agente patógeno dañino para las plantas o productos vegetales* [4] ya sea insecto, microorganismo (hongos, bacterias, etc.), mamífero (roedores), u otra planta (maleza).

Estudios demográficos demuestran que la población mundial ha experimentado un acusado aumento desde la década de los 60, lo cual, unido a cambios en los hábitos alimenticios, hace que sean necesarias prácticas agrícolas que aseguren una producción suficiente de alimentos a un precio competitivo. La solución a este problema se encontró en el cambio hacia una agricultura de tipo intensivo basada en monocultivos, que produce más cantidad de productos con menores costes.

La contrapartida a este tipo de agricultura es que reúne las condiciones idóneas para que surjan distintas plagas: la existencia de monocultivos supone una importante fuente de alimento para diversas especies que proliferan formando colonias de un gran número de individuos y que se convierten en una plaga por su efecto destructivo. La actuación de dichas plagas origina pérdidas económicas tanto para los agricultores por la poca productividad, como para los consumidores debido al aumento de los precios, y trae asociada la aparición de problemas relacionados con el abastecimiento alimenticio de una población en continuo crecimiento.

Se hace por lo tanto necesaria la utilización de productos que, siendo inocuos para el hombre, eliminen o mitiguen el efecto de estas plagas sin dañar a otras especies animales o vegetales más allá de las realmente problemáticas. Con este objetivo han surgido multitud de productos que han ido evolucionando de una forma paralela al desarrollo de la agricultura, de la propia evolución de los organismos y de las preocupaciones medioambientales. El uso masivo e inadecuado de estos preparados ha ocasionado una amplia dispersión de productos químicos en el medioambiente, lo que los ha convertido en una amenaza, puesto que no dejan de ser, en su mayoría, sustancias tóxicas que además pueden degradarse en subproductos en ocasiones más nocivos que los originales y que resultan muchas veces, al igual que sus predecesores, también bioacumulables.

1. ANTECEDENTES

Desde el inicio de la agricultura, el hombre ha recurrido a distintas combinaciones de sustancias naturales para asegurar una buena producción. La utilización de productos químicos inorgánicos para destruir insectos indeseados se remonta a la Grecia antigua. Homero menciona la utilidad del azufre quemado como fumigante, mientras que escritos romanos del primer siglo recogen testimonios de la utilización de arsénico como insecticida y aluden al empleo de sosa y aceite de oliva para tratar las semillas de leguminosas [5]. En el siglo XVI se usaban compuestos a base de arsénico como insecticida y comenzaba a ser frecuente el uso de la nicotina extraída del tabaco con el mismo fin. A principios del siglo XIX ya era una práctica común en agricultura la utilización de cenizas, azufre, cobre, compuestos arsenicales, tabaco molido, cianuro de hidrógeno, compuestos de mercurio, zinc, fósforo y plomo, etc. para luchar contra los insectos y asegurar los cultivos. En el año 1922 comienzan a utilizarse los aceites insecticidas y al mismo tiempo se descubre la acción pesticida de la flor de pelitre. Actualmente, a partir de ella se obtiene un insecticida conocido como piretrina.

Es a partir de la segunda guerra mundial, alrededor de 1950, cuando se produce el cambio de una agricultura tradicional a una agricultura intensiva gracias a las variedades mejoradas genéticamente y al empleo de fertilizantes y de pesticidas; surge entonces lo que hoy

se conoce como **Agricultura moderna**, apoyada por grandes avances en el campo de la **Agroquímica**. Este cambio, conocido como “**revolución verde**”, se desata ligado a las dos grandes Guerras Mundiales; en la primera, Alemania se vio obligada a invertir en industria química debido al bloqueo de suministros de compuestos nitrogenados al cual estaba sometida. Después de la guerra debía buscar una salida para amortizar los gastos invertidos en sus instalaciones, producciones e investigación, y la nueva agricultura en auge se presentó como la solución ideal. De igual forma, al acabar la segunda guerra mundial, muchas armas químicas cambiaron sus aplicaciones del campo de batalla al campo de cultivo, y una vez más la industria química fue redirigida al ámbito agrícola, de forma que no solo creció en el sentido de producción sino también en el aspecto de investigación y síntesis.



Figura I.A.1. Pintura que ilustra el uso de pesticidas en la antigüedad.

En líneas generales, puede decirse que la gran revolución en el uso de los productos orgánicos de

síntesis en la agricultura coincide aproximadamente con el inicio de la Segunda Guerra Mundial. Los grandes descubrimientos que dan importancia a los agroquímicos fueron sobre todo el DDT (1,1'-(2,2,2-tricloroetilideno)bis[4-clorobenceno]), cuyas propiedades insecticidas fueron descubiertas por Müller en 1940, y el 2,4-D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético). Ambos, insecticida el primero y herbicida el segundo, presentan un efecto plaguicida mucho mayor que sus homólogos inorgánicos que habían sido utilizados hasta el momento, y que fueron puestos en desuso con rapidez; las estadísticas hablan de una caída desde el 75% al 15% en la venta de productos químicos inorgánicos con fines plaguicidas entre 1945 y 1950.

El DDT y otros pesticidas de síntesis, jugaron un doble papel puesto que por su efecto fitosanitario, ejercían un control muy efectivo sobre las plagas mitigando sus efectos en las plantaciones, pero también fueron responsables de la disminución en la transmisión de enfermedades a través de insectos, como la malaria o la peste bubónica que causaban la muerte a millones de personas.

Las consecuencias ecológicas del uso masivo de pesticidas no tardaron en hacerse notar. En 1962 se publica **Primavera Silenciosa** (Rachel Carson) en donde se advierte de los efectos perjudiciales de los pesticidas en el medioambiente. Éste se considera como el primer libro divulgativo sobre ecologismo y sería el punto de partida para la concienciación social hacia la **Agricultura Ecológica**.

Actualmente existe una legislación en continuo desarrollo y evolución que regula la aplicación de fitosanitarios y controla los residuos de los mismos en distintas matrices medioambientales y agrícolas. La tendencia en estos últimos años ha sido la de disminuir la utilización de plaguicidas químicos, bien por sus posibles efectos tóxicos para seres humanos, bien por conciencia ecológica de agricultores y consumidores. Pero lo cierto es que la utilización de estos productos es todavía necesaria y beneficiosa para la sociedad, pues aunque la restricción en su uso genera una situación asumible para los productores, la erradicación de la aplicación de estos preparados conllevaría una pérdida de producciones que se estima próxima a la tercera parte de las cosechas [6], además del aumento de transmisión de enfermedades a través de insectos.

Tabla I.A.1. Evolución en la aplicación de pesticidas a lo largo de la historia.

Año / Período	Plaguicidas usados
Hace 2000 años	Aceites, cenizas
Hace 1000 años	Compuestos arsénicos
1650	Rotenona
1690	Nicotina extraída del tabaco
1860 – 1890	Derivados del arsénico, emulsiones de aceites, piretrinas, naftaleno

Año / Período	Plaguicidas usados
1922	Aceites insecticidas
1940-1945	Descubrimiento del DDT. Comienzo del uso de pesticidas orgánicos sintéticos con la aplicación de organoclorados. Utilización del primer herbicida: 2,4-D
1950-1955	Segunda generación de pesticidas sintéticos: Organofosforados, carbamatos y ureas
1955-1960	Introducción de las triazinas y sales de amonio cuaternarias
1960-1980	Utilización de fungicidas, e introducción de la tercera generación de pesticidas (sulfonilureas y piretroides)
Actualmente	Control biológico. Pesticidas nicotinoideas y plaguicidas ecológicos (feromonas, esterilizantes)

2. COMPOSICIÓN DE PRODUCTOS COMERCIALES DE ACCIÓN FITOSANITARIA

Aunque al hablar de pesticida de forma general nos referimos a la sustancia química que tiene efecto sobre el organismo a tratar, en realidad y de forma estricta, un pesticida es un producto o preparado resultante de la mezcla en proporción fija de **[1-3]**

- **Principio activo:** es la sustancia, natural o sintética, que ejerce la acción plaguicida.

- **Coadyuvantes:** aquellas sustancias que modifican adecuadamente las propiedades físicas y químicas de los preparados creando condiciones óptimas para la actuación del principio activo, aumentando el rendimiento del producto aplicado (por ejemplo tensoactivos, fluidificantes, estabilizantes...).

- **Productos inertes:** se trata de sustancias sin acción plaguicida pero que aportan al preparado las características físicas óptimas para la dosificación y aplicación del mismo (por ejemplo disolventes).

- **Aditivos:** aquellas sustancias que se añaden al preparado y que, sin tener influencia en la eficacia del plaguicida, suelen afectar a aspectos físicos del producto comercial, para cumplir prescripciones reglamentarias o requisitos legales (colorantes, repulsivos, etc).

3. CLASIFICACIÓN

Existen múltiples características que diferencian los pesticidas entre sí, de forma que existen igualmente multitud de clasificaciones posibles. De todas ellas, quizás las más interesantes para el estudio realizado en esta Tesis son las que atienden al punto de vista **funcional, químico y toxicológico**. No obstante, hay que tener en cuenta también la **forma de actuación** y el **momento de aplicación** de estas sustancias para evaluar correctamente su peligrosidad y la presencia de residuos en el medioambiente.

3.1. SEGÚN SU FUNCIÓN

Esta clasificación atiende al tipo de organismo sobre el cual el pesticida realiza su acción. Los más importantes se resumen en la siguiente tabla.

Tabla I.A.2. Clasificación de agroquímicos según el tipo de plaga que controlan.

Tipo de pesticida	Organismos sobre los que actúan
Fungicidas	Hongos (incluyendo añublos, moho, royas, etc)
Insecticidas	Insectos y otros artrópodos,
Herbicidas	Malezas (comúnmente “malas hierbas”)
Acaricidas	Ácaros que se alimentan de plantas y animales
Molusquicidas	Caracoles y babosas
Nematicidas	Nematodos (gusanos microscópicos que se alimentan en las raíces de las plantas)
Ovicidas y feromonas	Huevos, o individuos adultos para que pierdan la capacidad de reproducción
Rodenticidas	Ratones y otros roedores
Avicidas	Aves
Antibióticos	Microorganismos de tipo bacteriano
Biocidas	Todo tipo de organismo vivo

Los más utilizados en agricultura son los fungicidas, insecticidas y sobre todo herbicidas.

-Herbicidas: son utilizados para controlar todas aquellas plantas, conocidas comúnmente como “malas hierbas”, que compiten con los cultivos por los nutrientes, el agua y la luz del sol. Estos productos aplicados sobre las especies no deseadas producen distintos efectos como dañar las células de las hojas alterando la función fotosintética, variaciones en las raíces que afectan a la absorción de nutrientes, o inhibición de la

germinación de semillas o su crecimiento así como destrucción de tejidos de hojas y tallos [7].

-Fungicidas: Tienen un amplio campo de aplicación, desde la industria hasta la aricultura o el ámbito doméstico. Controlan la actividad en criptógamas (hongos y algunas bacterias) y otras enfermedades de las plantas tanto en tratamientos de preemergencia como postemergencia, en pre o postsiembra. No suelen ser la causa de procesos tóxicos agudos debido a su baja absorción en mamíferos.

-Insecticidas: Proporcionan protección a los cultivos y las cosechas al controlar los insectos que las destruyen a través de una amplia variedad de modos de acción, incluyendo procedimientos neurotóxicos, efectos musculares, esterilización, alteraciones hormonales y mecanismos físicos. Las cuatro familias más importantes son los organoclorados, los organofosforados, los piretroides y los carbamatos.

3.2. SEGÚN LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL PRINCIPIO ACTIVO

La estructura del principio activo de un pesticida marca en general su modo de acción con respecto a la plaga. Además, conociendo la estructura se puede predecir también el impacto a nivel medioambiental y la reactividad bajo distintas condiciones. Por esta razón resulta muy práctico tener una visión en función de la estructura y familia química a la cual pertenecen los pesticidas de uso más habitual, que se resumen a continuación.

Tabla I.A.3. Clasificación de pesticidas según la familia química de su principio activo [6].

Herbicidas		Insecticidas		Fungicidas	
Amidas	Acetocloro, alacloro	Carbamatos	Aldicarb,	Alifáticos	Cimoxanil
Ácidos aromáticos	Dicamba, clorpiralid,	Nicotinoides	Imidacloprid, tiametoxam	Amidas	Fenoxanil, metalaxil
Nitroanilinas	Trifluralín	OCs	DDT, aldrín	Compuestos aromáticos	Bifenilos y esteres difenlicos
Nitrilo	Bromoxinil, ioxinil	OPs	Mevinfós, diclorvós	Azoles	Carbendazim
OPs	DMPA, glifosato	Pirazol	Firponil	Carbamatos	Benomil, tirad
Fenoxiácidos	2,4-D, MCPA	Piretroides	Permetrina	Imidas	Captán, folpet
Piridinas	Clorpiralid, fluroxipir			OPs	Pirazofós, triamifós
Compuestos de amonio cuaternario	Diquat, paraquat				
Carbamatos	Clorprofam				
Triazinas	Atrazina, propazina				
Ureas	Metoxurón, linurón				

3.3. SEGÚN SU TOXICIDAD Y PELIGROSIDAD

La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda la calificación de los pesticidas en función de la toxicidad y peligrosidad que presentan los compuestos al contacto por inhalación, ingestión y/o penetración cutánea. En función del efecto del principio biológicamente activo, los pesticidas pueden ser, desde altamente tóxicos hasta moderadamente tóxicos, dependiendo del valor del LD₅₀. Este parámetro se conoce como “**dosis letal**” y se define como “*el estimado estadístico de la cantidad de miligramos de producto tóxico por kilogramo de peso requerida para matar al 50% de una población de ensayo*” [8]. De esta forma, valores pequeños de LD₅₀ implican que la sustancia es altamente tóxica.

Atendiendo a estos aspectos, se distinguen 4 grupos de pesticidas, que se resumen a continuación (Tabla I.A.4).

Tabla I.A.4. Clasificación de pesticidas según la toxicidad [8].

Categoría (<i>Peligrosidad</i>)	LD ₅₀ (mg /kg)				
	Riesgos	Vía oral		Vía dérmica	
		Sólido	Líquido	Sólido	Líquido
Ia: Extremadamente tóxicos (<i>Extremadamente peligroso</i>)	Riesgos extremadamente graves, agudos o crónicos, e incluso la muerte	< 5	< 20	< 10	< 40
Ib: Altamente tóxicos (<i>Altamente peligroso</i>)	Riesgos graves, agudos o crónicos.	5 – 50	20 – 200	10 – 100	40 – 400
II: Moderadamente tóxicos (<i>Moderadamente peligroso</i>)	Riesgos de gravedad limitada	50 – 500	200 – 2000	100 – 1000	400 – 4000
III: Ligeramente tóxicos (<i>Levemente peligroso</i>)	Riesgos leves	500 – 2000	2000 – 3000	1000 – 4000	4000 – 6000
U: Con efectos tóxicos improbales.	No entrañan riesgos apreciables	> 2000	> 3000	> 4000	> 6000

3.4. EN FUNCIÓN DEL MODO DE ACTUACIÓN

Es posible hacer una diferenciación de los productos fitosanitarios atendiendo al modo en que la plaga es atacada. Se exponen a continuación los de uso más habitual (tabla I.A.5).

Tabla I.A.5. Clasificación de pesticidas en función del modo de actuación sobre la plaga.

Tipo de pesticida	Modo de actuación
De contacto	Actúan a partir del contacto físico con la plaga. Su acción tóxica es de muy poca duración y se descomponen rápidamente en sustancias no fitotóxicas o se evaporan.
Sistémico	Son absorbidos en el punto de aplicación (hojas, raíz...) y se trasladan mediante la savia a todo el resto de la planta, hasta la parte en la que son efectivos (brotes, hojas...).
Repelente/ Atrayente	Afectan al sentido del tacto, del gusto y del olfato de los organismos correspondientes provocando la repulsión o atracción de los mismos.
De ingestión	Atacan por medio del aparato digestivo.
Residual	Generalmente son herbicidas. Se aplican antes de que brote la planta y permanecen en el suelo el tiempo suficiente como para ir matando las malas hierbas en el momento de su germinación.

3.5. EN FUNCIÓN DEL MOMENTO DE APLICACIÓN.

Esta clasificación atiende a pesticidas aplicados sobre todo en el ámbito agrícola, mayormente cuando se trata de herbicidas. Es de especial interés conocer el modo en que han de utilizarse estos productos sobre los cultivos, puesto que la forma en que han sido aplicados influye enormemente en la presencia de residuos en el medioambiente y en la disponibilidad del pesticida para contaminar otros organismos.

Tabla I.A.6. Clasificación de fitosanitarios en función del modo de aplicación sobre el cultivo.

	Tipo de pesticida	Momento de aplicación
Tratamiento preventivo	Presiembra o preplantación	Se aplican después de la preparación del suelo, pero antes de la siembra o plantación.
	Preemergencia	Son los productos que se aplican después de la siembra de la planta cultivada, pero antes de que brote.
	Postemergencia	Se aplican después del nacimiento de las malas hierbas y de la planta cultivada

4. PROBLEMÁTICA QUE GENERA EL USO DE PESTICIDAS

4.1. EFECTOS SOBRE PLAGAS Y OTROS ORGANISMOS

La utilización de productos fitosanitarios, si bien tiene un efecto positivo a nivel de producciones de cultivos y de control de transmisión de enfermedades a través de insectos, trae asociado un tipo de riesgos que pueden generar problemas sobre el control de plagas, debidos, sobre todo, a un mal uso y aplicación de estos productos [9-11], entre los que cabría destacar:

-Resistencia genética. Se trata de un fenómeno consistente en la adaptación de los individuos de una plaga que evoluciona haciéndose resistente al pesticida aplicado o a la dosis. Esto conlleva cambios en la genética de los organismos y obliga a aplicar cantidades mayores de pesticidas o productos más agresivos para combatirlos. Debido al tamaño de las poblaciones de las plagas y como en general las generaciones de estos organismos se suceden unas a otras con rapidez, la resistencia genética se ha extendido rápidamente en muy pocos años.

-Alteraciones en el ecosistema. A pesar de que muchos fitosanitarios son muy selectivos en su acción pesticida, lo cierto es que la mayoría matan no solo a la plaga, sino también a otros insectos beneficiosos. Este es el caso de las abejas, mariquitas y otros organismos que muchas veces son enemigos naturales de ciertas plagas, y que son eliminados de forma indeseada. Los estudios demuestran que multitud de especies en distintos medios se han visto afectadas por el aumento de la aplicación de estos productos.

-Aparición de nuevas plagas. En ciertas ocasiones, insectos cuya acción estaba controlada en un ecosistema en equilibrio se manifiestan como plagas debido a la eliminación indeseada de organismos que mantenían controlado su número y por lo tanto su acción.

4.2. BIOACUMULACIÓN Y BIOMAGNIFICACIÓN

Algunos pesticidas tienen estructuras químicas muy estables y tardan años en descomponerse a formas menos tóxicas. Además, en muchos casos, estos productos no son fácilmente eliminados de los organismos debido a su baja solubilidad en agua y tienden a acumularse en los tejidos grasos. De esta forma un pesticida que se encuentra en concentraciones muy bajas en el entorno, puede concentrarse hasta niveles importantes en distintos tejidos de animales, en un proceso se conoce como bioacumulación. Por otra parte,

un caso particular de bioacumulación es el conocido como biomagnificación; se trata de la transmisión de pesticidas bioacumulados a lo largo de la cadena alimenticia de forma que las concentraciones de estos compuestos aumentan progresivamente a medida que se asciende en la cadena trófica, viéndose afectados con mayor intensidad los individuos situados en los niveles más altos de la misma.

4.3. RIESGOS PARA LA SALUD HUMANA

La gran mayoría de productos fitosanitarios son nocivos para el ser humano, exhibiendo efectos tóxicos muy variados que dependen en gran medida de la concentración del preparado y del tiempo de exposición al mismo. Durante su utilización, el contacto directo con altas dosis de pesticidas puede producir intoxicaciones agudas e incluso la muerte, pero si se trata de bajas dosis con largos períodos de contacto puede llegar a provocar enfermedades como algunos tipos de cáncer o disrupciones endocrinas, entre otras. El número de personas que mueren por pesticidas es bajo pero decenas de miles de personas se envenenan con ellos todos los años padeciendo síntomas más o menos graves. La mayoría son agricultores u otros profesionales que trabajan con estos productos, sobre todo personas poco entrenadas para su uso, dándose un mayor índice de intoxicación en los países en vías de desarrollo.

Además hay que tener en cuenta que en muchos casos la alimentación supone una vía de entrada al organismo, ya sea a partir el producto directamente tratado o por transferencia a través de la cadena trófica.

5. CONTAMINACIÓN MEDIOAMBIENTAL

La efectividad como fitosanitarios de los plaguicidas depende principalmente de su movilidad, persistencia y transferencia. Deben ser **suficientemente móviles** como para alcanzar su objetivo y **convenientemente persistentes** para conseguir eliminar el organismo que se desea controlar, pero estas dos características determinan a su vez la capacidad de migración de los plaguicidas en aguas y suelos, y por lo tanto su potencial para contaminar el medio. Según *Barriuso* [12], el impacto de los pesticidas sobre el medio puede estimarse en base a la toxicidad y el grado de exposición al mismo, relacionado directamente con la disponibilidad del pesticida en el medio. Ésta depende, entre otros, de factores físico-químicos, microbiológicos e hidrológicos que afectan respectivamente a la movilidad, persistencia y transferencia de la sustancia aplicada, tal y como se muestra en este esquema:

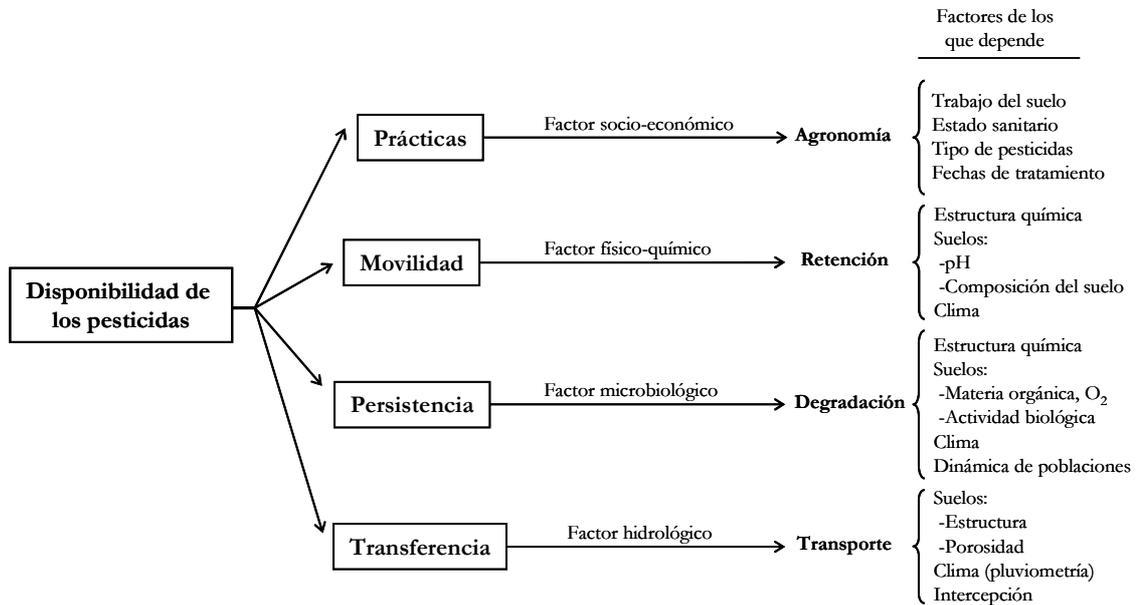


Figura I.A.2. Factores que condicionan la disponibilidad de un pesticida en el medio.

Los compuestos que actúan como agroquímicos son normalmente moléculas orgánicas con una alta movilidad, de forma que la migración de los mismos a través del agua, del suelo y del aire, resulta un proceso relativamente sencillo. De esta forma, ciertos compuestos pueden trasladarse desde el lugar que ha sido tratado y llegar a contaminar zonas alejadas del foco de aplicación. Por este motivo es de especial interés conocer los procesos que afectan a la movilidad de los pesticidas, para poder evaluar a priori el comportamiento de los mismos y la presencia en aguas, suelos y aire.

Cuando se aplica un plaguicida se produce un depósito en la planta que es eliminado progresivamente, con mayor o menor rapidez, en función de factores tales como la tasa de crecimiento del vegetal, condiciones ambientales (viento y lluvia), propiedades físico-químicas del plaguicida (volatilización y solubilización) y degradación química, que puede ocurrir en el interior de la planta (para los plaguicidas con poder penetrante) o en la superficie de la misma, en cuyo caso juega un papel fundamental la radiación solar. [13]

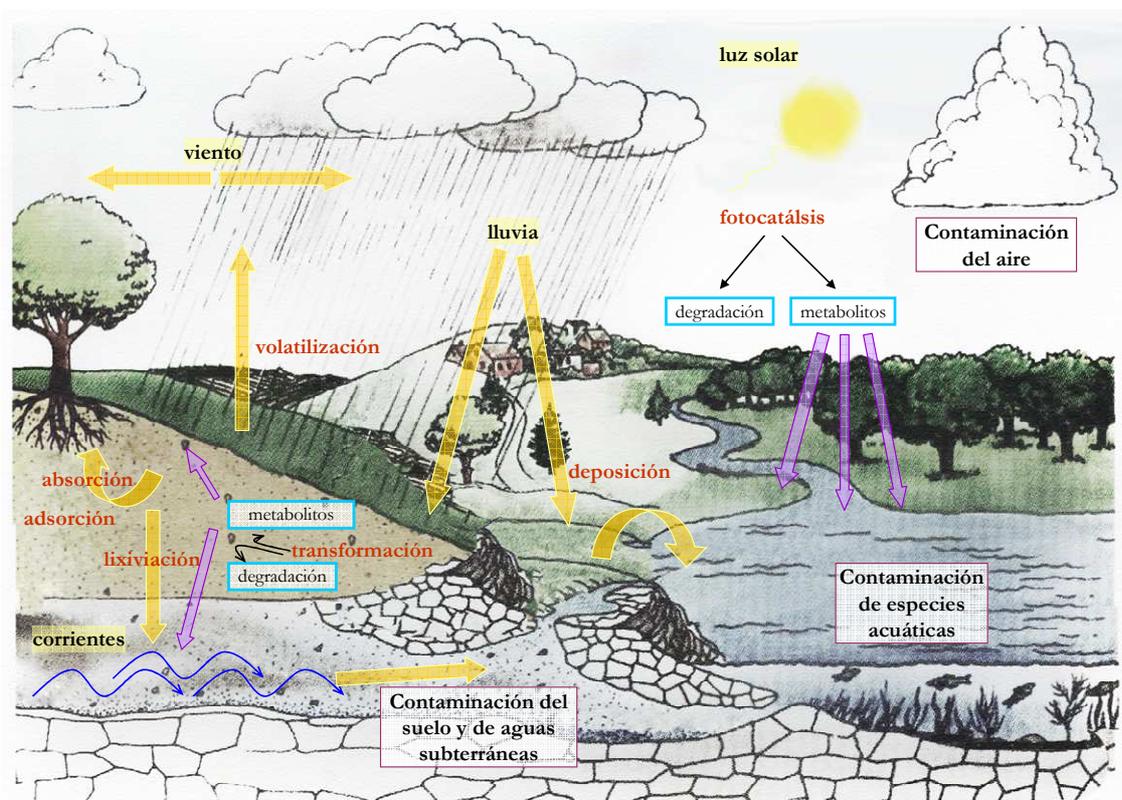


Figura I.A.3. Ilustración esquemática de la movilidad de pesticidas en el medioambiente

La **volatilización** es un proceso regido por la ley de Henry, que se produce en mayor o menor medida dependiendo de la presión de vapor del compuesto, de manera que aquellos que presentan alta presión de vapor tenderán a volatilizarse, excepto que también sean muy solubles en agua. Además de los parámetros físico-químicos hay que tener muy en cuenta los climatológicos y ambientales puesto que la temperatura y el viento tienen gran influencia en el grado de volatilización y dispersión del plaguicida.

En general, se puede decir que los compuestos con baja solubilidad y alta presión de vapor difícilmente contaminarán las aguas subterráneas, si bien existen otros factores que intervienen en la movilidad de los plaguicidas e influyen sobre los mecanismos de adsorción y degradación de los mismos.

Una vez el compuesto se ha introducido en el interior del suelo, la movilidad de estas sustancias depende de procesos que determinan el **grado de lixiviación** de plaguicidas hacia el acuífero, fundamentalmente adsorción (K_{oc}) y degradación, y de la actividad biológica de microorganismos de la capa.

La **solubilidad** en el agua es el primer factor a considerar en el proceso de lixiviado de los plaguicidas. Ésta aumenta cuando los compuestos están en forma iónica, siendo más solubles los cationes que los aniones. Otro factor que relacionado con el proceso de lixiviado y con la solubilidad, es el grado de hidrofilia que tengan los compuestos, determinado por el coeficiente de reparto octanol-agua (K_{ow}). Sustancias con un alto valor de K_{ow} implican un reparto favorable hacia la fracción de octanol, y denotan un comportamiento hidrofóbico, por lo que estas sustancias no tienden a disolverse en agua y se quedarán retenidas fuertemente en superficies lipídicas o de carácter más apolar. Así pues, los compuestos organoclorados son poco solubles en agua debido a su carácter apolar, los organofosforados y derivados del nitrógeno son, en general, más solubles y los herbicidas ácidos son los menos solubles.

La **cantidad disponible** de pesticidas en el suelo se ve afectada por procesos de **adsorción** en la fracción sólida del mismo, sobre todo en arcilla y materia orgánica. Esta última fracción coloidal está compuesta por una compleja mezcla de ácidos húmicos y fúlvicos que adsorben fuertemente a los pesticidas catiónicos, mientras que los pesticidas ácidos se concentran en la solución del suelo y en las fases gaseosas debido a que son poco retenidos sobre la fracción sólida [14]

La medida en que estos procesos afectan a la disponibilidad del compuesto se expresa mediante el coeficiente de reparto normalizado respecto al contenido de carbono orgánico (K_{oc}), que puede presentar variaciones de varios órdenes de magnitud en función de las propiedades físico-químicas del plaguicida y de la composición química del suelo. K_{oc} se define como la relación entre la constante de distribución del compuesto (K_d) y el porcentaje de materia orgánica presente en el suelo. Valores elevados de K_{oc} indican que el plaguicida se fija fuertemente a la materia orgánica, por lo que cabe esperar una baja lixiviación del producto hacia las capas freáticas del suelo.

Probablemente, el proceso más determinante del comportamiento de los plaguicidas sea la **transformación**, es decir, el conjunto de cambios en la estructura química de los compuestos a través de reacciones de oxidación, reducción, hidrólisis, sustitución o eliminación de grupos funcionales, o a la fragmentación de la estructura dando lugar bien a metabolismo de carácter orgánico, o bien a compuestos inorgánicos como productos finales de la reacción (CO_2 , H_2O , haluros, amonio, fosfato, etc.), en cuyo caso el proceso se conoce como **degradación**. La transformación puede tener lugar por vía química, fotoquímica o biológica, siendo ésta última la predominante en suelo debido a la **actividad de microorganismos**;

Todos estos procesos dependen de las propiedades físico-químicas de los compuestos y de factores como el **pH del medio**, que determina la disponibilidad y reactividad de los pesticidas en suelos, sobre todo cuando se habla de herbicidas ácidos. Éstos tienen tendencia a ionizarse en solución acuosa y generar aniones; si el pH del medio es superior al pKa del compuesto, el equilibrio de disociación se ve desplazado de forma que predominará la forma aniónica, que apenas sufre adsorción sobre las arcillas aunque sí sobre la materia orgánica, quedando el compuesto inactivo en el suelo. En general, aquellos pesticidas con un pK similar al pH del suelo son fuertemente retenidos y no sufren lixiviación, aunque su disponibilidad para las plantas está reducida.

El grado de lixiviación de los plaguicidas puede estimarse conociendo el **índice GUS (Groundwater Ubiquity Score) [15]** que funciona como un **indicador de contaminación potencial de los acuíferos** permitiendo clasificar pesticidas en lixiviables ($GUS > 2,8$), no lixiviables ($GUS < 1,8$) y de transición ($1,8 \leq GUS \leq 2,8$). Se trata de una aproximación empírica en donde se tiene en cuenta la contribución de la K_{oc} del compuesto y el tiempo de vida media del mismo, que vienen a representar respectivamente los efectos de tiempo de residencia y degradación sobre los procesos de transporte de plaguicidas a los acuíferos.

$$GUS = [\log t_{1/2}] \cdot [4 - \log K_{oc}]$$

Por lo tanto, la presencia de pesticidas en el medioambiente puede tener distintas consecuencias en función de la movilidad y disponibilidad que presenten. Los **efectos nocivos** de los fitosanitarios sobre el medioambiente se pueden agrupar en los siguientes grupos en función de si son efectos a corto o largo plazo y también dependiendo de la zona contaminada:

Tabla I.A.7. Efectos de los fitosanitarios sobre el medioambiente.

Tipo de ambiente	Efectos	
	Efectos a largo plazo	Efectos a corto plazo
Ambiente cercano	Contaminación de los suelos tratados con fitosanitarios muy persistentes que pueden originar resistencia de plagas, contaminación de cultivos, transferencia de estos compuestos a la cadena trófica.	Contaminan el ambiente abiótico (agua subterránea y superficial, aire y suelo) y biótico (afectan a organismos no-diana). Alteran el equilibrio fisiológico de los organismos expuestos a ellos
Ambiente lejano	Persistencia de plaguicidas encontrados en lugares lejanos del punto de aplicación tras sufrir procesos de transporte como lixiviación, transporte aéreo o por medio de otros organismos.	

	Efectos
Ambiente abiótico	La contaminación del agua y del aire por lixiviación y volatilización de los compuestos desde el suelo, provoca que éstos se depositen en lugares lejanos de su punto de aplicación. Si el compuesto persiste en los suelos puede afectar con su acción plaguicida a futuros cultivos.
Ambiente biótico	En el suelo afectan a bacterias y hongos nitrificantes, rompiendo el equilibrio natural de este medio. Si se movilizan, cuando están presentes en agua tienen un efecto negativo sobre algas, peces y también sobre plancton, por lo que afecta directamente a la base de la cadena trófica. Afectan también a aves y mamíferos, alterando el equilibrio ecológico y los organismos afectados.

5.1. CONTAMINACIÓN DIFUSA

Actualmente existe una preocupación creciente por la contaminación difusa frente a la contaminación puntual. La **contaminación difusa** se refiere a la descarga de contaminantes en el medio, principalmente acuático, a partir de una serie de puntos dispersos difícilmente acotables. Este tipo de contaminación está estrechamente relacionada con la aplicación de agroquímicos, puesto que como se ha expuesto anteriormente, una vez aplicados, estos compuestos sufren procesos de transporte que se deben a multitud de variables apenas controlables, suponiendo focos de contaminación difícilmente reconocibles a priori como tal.

Las actividades propias de la agricultura generan focos de contaminación difusa intermitentes, ligados a los calendarios propios de actividades agrícolas, como épocas de siembra, fertilización, o preparación del terreno. Asimismo los factores ambientales que puedan promover el transporte de pesticidas, como son las precipitaciones, propician la existencia de este tipo de contaminación

6. EVOLUCIÓN Y DESARROLLO DEL MERCADO DE PESTICIDAS

Desde que se inició la revolución verde, a mediados del siglo pasado, la aplicación de pesticidas en cultivos se ha visto incrementado en torno al 5000%.

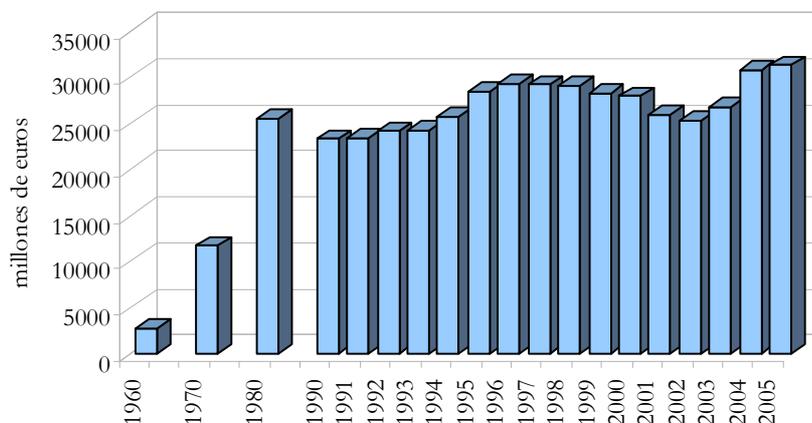


Figura I.A.4. Ventas de pesticidas industriales durante el período de 1990 al 2005 a nivel mundial.

Según estudios independientes de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Asociación para la Protección del Cultivo en Europa (ECPA), la década de los 90 estuvo marcada por un constante aumento en el empleo de fitosanitarios, si bien a principios del presente siglo no se continuó con esta tendencia [16, 17].

El consumo de pesticidas es claramente más alto en los países desarrollados, con economías más fuertes y mejores condiciones para el cultivo intensivo. No obstante existen muchos otros factores de diversa índole que determinan la extensión en que se produce la aplicación de fitosanitarios en las distintas áreas geográficas (factores naturales, como climatología; socio-económicos como tasas de comercio o la seguridad alimentaria; y agronómicos como la aparición de nuevas tecnologías).

Analizando las ventas de pesticidas en los últimos años (figura I.A.4), se puede ver como claramente los productos más aplicados a nivel mundial, son los herbicidas seguidos de insecticidas y fungicidas. Hoy en día se estima que se utilizan unos 2,5 millones de

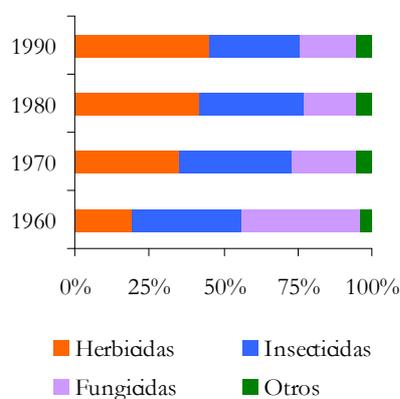


Figura I.A.5. Consumo de pesticidas a nivel mundial [13]

toneladas de pesticidas industriales cada año [16].

7. DISPOSICIONES LEGALES RELATIVAS A PLAGUICIDAS.

La contaminación medioambiental ha generado una situación de preocupación mundial que ha derivado en la aplicación de una serie de medidas y normas estableciendo unas directrices de actuación con el objetivo de prevenir y paliar los efectos negativos derivados del uso de químicos sobre el medioambiente y la salud de organismos que en él habitan. A tal efecto, se ha establecido en el ámbito de la Comunidad Europea una normativa relativa al comercio, aplicación y presencia de residuos de productos químicos en el medioambiente y productos relacionados con la seguridad alimentaria.

7.1. REGULACIONES DEL COMERCIO DE PLAGUICIDAS EN LA UNIÓN EUROPEA

La Unión Europea ha regulado la **comercialización** de agroquímicos bajo la **Directiva 91/414/CEE**, que armoniza los requisitos y los procedimientos de autorización de los productos fitosanitarios, con objeto de proteger la salud humana y el medio ambiente. En el anexo I de dicha directiva se establece una *“lista comunitaria de las sustancias activas autorizadas”* que *“deben revisarse periódicamente, con el objeto de tener en cuenta los avances de la ciencia y de la tecnología y de los estudios de impacto relativos a la utilización efectiva de los productos fitosanitarios que contengan dichas sustancias”*. [18]

Por otra parte, se ha regulado también la exportación e importación de productos químicos, bajo la Decisión 2006/730/CE que aprueba las decisiones tomadas en el **Convenio de Rotterdam** de 1998, sobre el procedimiento de consentimiento fundamentado previo (**Prior Informed Consent – PIC**), que tiene por objeto mejorar la reglamentación internacional del comercio de determinados productos químicos y plaguicidas peligrosos. Además, el Reglamento (CE) N° 689/2008 el Parlamento Europeo y del Consejo establece las bases legales a seguir en el caso de exportaciones e importaciones de productos químicos peligrosos, recogidos en el anexo III del convenio de Rotterdam. [19, 20]

Este convenio establece una **lista PIC de plaguicidas**, que funciona como un sistema de información comunitario sobre todas las prohibiciones y restricciones severas aplicadas a nivel estatal sobre estos productos. Aquellos plaguicidas que, conforme a los criterios del

Convenio, han sido prohibidos por dos países de dos regiones del mundo, ingresan a una Lista PIC de forma que los países importadores deben indicar si permiten o prohíben su comercio. Actualmente la lista incluye 40 productos químicos: **29 plaguicidas**, incluyendo cuatro formulaciones de plaguicidas extremadamente peligrosas, y 11 productos químicos industriales. [21]

Además de las citadas anteriormente, otro documento que hace referencia a sustancias altamente contaminantes es el elaborado por PAN (*Pesticide Action Network*) que en 1985 publicó la lista de la **Docena Sucia** [22] relativa doce plaguicidas considerados extremadamente peligrosos y utilizados ampliamente a nivel mundial, con el objetivo de eliminar estos productos del mercado y reemplazarlos con soluciones sostenibles.

7.2. REGULACIONES EN LA APLICACIÓN DE PESTICIDAS Y EN LA PRESENCIA DE RESIDUOS.

Debido a la toxicidad de los productos fitosanitarios y a la contaminación medioambiental, la utilización de productos químicos con fines agrícolas está regulada siguiendo unas normas que se centran en la seguridad alimentaria y el cuidado del medioambiente. Para que un pesticida sea apto para su aplicación por parte del agricultor, ha de someterse a una serie de estudios que demuestren que resulta seguro y efectivo, por lo que las cantidades máximas de residuos presentes en ciertos productos están reguladas por distintas normativas con las que se pretende garantizar la inocuidad de los alimentos fijando un **nivel máximo de residuo (LMR)** que no suponga un riesgo para la salud ni para el medioambiente [23].

7.2.1. Directiva Europea 96/23/CE

El **Derecho alimentario** es una rama del Derecho relativamente reciente cuya área de actuación se extiende desde la producción hasta el consumo de alimentos. Como se señaló anteriormente, los pesticidas pueden migrar de unos organismos a otros a lo largo de la cadena trófica, por lo que el nivel de residuos en ciertos alimentos de origen animal, también se encuentran incluidos dentro de una legislación comunitaria europea, así como los residuos de medicamentos veterinarios.

La Directiva Comunitaria establecida por la Unión Europea afecta a todo el ámbito de los estados miembros y por lo tanto es de obligado cumplimiento por los mismos. Desde 1996 se ha aplicado la **Directiva 96/23/CE** que establece las medidas de control de **residuos en animales vivos y en productos de origen animal** relativas a ciertos pesticidas. Con ello se persigue controlar el uso de sustancias, tanto fitosanitarias como veterinarias, dentro de los procesos de producción animal [24]. En el artículo 4 de dicha Directiva se especifica que *debe existir un plan de control de los residuos sometido a una coordinación centralizada*, de forma que *los estados miembros deben poner en marcha planes nacionales de control de residuos que se presentarán con carácter anual a la Comisión junto con los resultados de la puesta en marcha durante el año anterior y las medidas adoptadas para el seguimiento de los resultados no conformes*. Asimismo el artículo 7 de esta directiva establece *el número mínimo de muestras que se analizarán para cada producto alimenticio en función de la producción nacional* [25]. Además de los residuos de medicamentos veterinarios y plaguicidas, los anexos I y II de la Directiva 96/23/CE incluyen una lista de los contaminantes medioambientales que deben vigilarse en el marco de los planes de control de residuos.

Una serie de crisis relativas a la alimentación humana y animal (EEB, dioxina, etc.) pusieron de manifiesto los fallos en la concepción y la aplicación de la normativa alimentaria en la Unión Europea. A raíz de estos sucesos la Dirección general de Salud y Protección de los consumidores de la Comisión Europea publicó en el año 2000 el **Libro Blanco de seguridad Alimentaria** con el objetivo de describir un conjunto de acciones necesarias para completar y modernizar la legislación de la Unión Europea en el ámbito de la alimentación, y garantizar una mejor aplicación de la misma y un alto grado de seguridad alimentaria [26].

Una de estas medidas fue la creación en 2002 de la **Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria** (EFSA), una agencia comunitaria encargada de evaluar los riesgos relativos a la seguridad de alimentos destinados a la alimentación humana y animal. Algunas de las funciones que se le atribuyen a la EFSA son la de proporcionar los métodos científicos para alertar y detectar todos aquellos problemas que afecten a la Seguridad Alimentaria y fijar las líneas más importantes de investigación en este campo [27], fruto de las cuales se lleva a cabo la continua actualización de la Directiva 96/23/CE mediante Decisiones de la Comisión, que la regulan para que su aplicación esté en concordancia con la situación real de los riesgos alimentarios en cada momento [23].

7.2.1.2. Límite máximo de residuos (LMRs)

La Unión Europea ha fijado unos **niveles máximos de residuos (LMRs)** en distintos alimentos y matrices medioambientales tanto a nivel nacional como comunitario, en función de las prácticas agrícolas de cada área geográfica (tipo de cultivos, plagas existentes...), y teniendo

en cuenta el **consumo diario admisible (ADI)**. Los LMRs están propuestos por la **Reunión Conjunta FAO/OMS sobre Residuos de Pesticidas (JMPR)**, consistente en un grupo científico de la FAO experto en residuos de pesticidas en alimentos y medioambiente y el Grupo de Evaluación Central de la OMS [28] y aunque oficialmente no forman parte de la estructura de la Comisión del Codex Alimentarius, sí se encuentran recomendados por el Comité del Codex sobre Residuos de Pesticidas [29].

Desde 1976, multitud de LMRs fueron establecidos y revisados periódicamente dentro de los estados miembros de la Comunidad Europea. Se regularon los niveles máximos de residuo en productos alimenticios para más de 245 pesticidas en cereales y alimentos de origen animal (Directiva 86/362/CE) y frutas, hortalizas y otros productos de origen vegetal (Directivas 76/895/CE y 90/642/CE) [30]. Desde 1997, siguiendo las líneas de actuación de la Directiva 97/41/CE, los LMRs se han fijado de forma comunitaria para sustancias presentes en muestras agrícolas sin procesar, es decir, sin estar sometidas a tratamiento industrial (lo que podríamos denominar muestras brutas).

El **reglamento (CE) N° 396/2005**, de cumplimiento obligado para todos los estados miembros, recoge los valores máximos de residuos de pesticidas establecidos para productos de origen animal o vegetal [31], puesto que para multitud de combinaciones pesticida/producto no existían más que regulaciones a nivel nacional. Desde el 1 de Septiembre de 2008, el **Reglamento (CE) N° 839/2008** recoge una nueva regulación para residuos de pesticidas que simplifica y normaliza los LMRs existentes para todos los estados miembros de la Comunidad Europea, en relación no solo con los productos para consumo humano sino también para la alimentación animal [31-33].

7.2.1.3. Desarrollo de metodologías analíticas en base a las restricciones legales.

La investigación en materia de seguridad alimentaria ha de seguir las directrices fijadas en base a la legislación detallada en los apartados anteriores. Por otra parte la **Decisión de la Comisión Europea 97/747/CE**, fija los **niveles y frecuencias de muestreo** previstas en la **Directiva 96/23/CE** del Consejo, con vistas al control de ciertas sustancias y sus residuos en animales y productos de origen animal [34]

Los avances realizados en química analítica desde la adopción de la Directiva 96/23/CE han dejado obsoleto el concepto de métodos de rutina y métodos de referencia y lo han reemplazado por un planteamiento en el que se establecen criterios de funcionamiento y procedimientos de validación de los métodos. Además se hace necesario normalizar los criterios de interpretación de los resultados de los laboratorios oficiales de control para aplicar

la Directiva 96/23/CE de un modo común. **La Decisión de la Comisión Europea 2002/657/CE** establece normas relativas a la **aplicación y validación de los métodos analíticos** y fija criterios comunes de **interpretación de los resultados** analíticos de las muestras evaluadas para asegurar la calidad de los mismos [35].

Por otra parte la Dirección General de la Comisión Europea de Sanidad y Protección de los consumidores (DG-SANCO) ha publicado el documento SANCO/10684/2009 (que sustituye el publicado anteriormente –SANCO/3131/2007– y entró en vigor el 12 de Enero del 2010), en donde se especifica cómo realizar la validación de métodos analíticos en el caso de análisis de residuos de pesticidas en matrices alimentarias.

En esta línea, hay que tener en cuenta también la norma ISO 11843 que supone una guía para la estimación de ciertos parámetros de calidad del método analítico como son el límite de decisión – $CC\alpha$ – y capacidad de detección – $CC\beta$ –

Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, se han desarrollado en este trabajo, en lo relativo a seguridad alimentaria, dos metodologías para el análisis de residuos de pesticidas en **leche** y muestras de **colmenas**. En la tabla I.A.8 se muestran los LMRs establecidos por la Unión Europea según la legislación en vigor [31] para los compuestos estudiados en esta Tesis, de entre los 109 y 323 legislados para miel y leche respectivamente.

Tabla I.A.8. LMR en ng g^{-1} (ppb) establecidos en la Directiva 96/23/CE para los pesticidas analizados en esta Memoria [36]

	Leche y productos lácteos	Miel
Acetocloro	10	
Alacloro	10	
Bentazona	20 ^a	
Bromoxinil	10 ^a	
Carbetamida	50	
Clorfenvinfós	10	
Cloridazón	100	
Cloroxurón	50	
Clorpirifós	10	
Clortolurón	50	
Diazinón	10	
Dinoterb	50	
Diurón	50 ^a	
Fipronil	5 ^a	10 ^a
Imidacloprid	50	50

	Leche y productos lácteos	Miel
Ioxinil	10 ^a	
Isoproturón	50	
Malatión	20 ^a	
Metamitrona	50	
Metazacloro	50	
Metil pirimifós	50	
Metabenzthiazurón	50	
Metolacloro	50	
Monolinurón	50	
Quinmerac	50	
Simazina	50	50
Tiametoxam		10 ^a
Terbutilazina	50	
Triadimefón	100 ^a	
Triazofós	10	

^a LMR establecido para la suma del compuesto y alguno de sus metabolitos.

Para aquellos alimentos que no presentan LMR, la ley establece que el proceso de validación se llevará a cabo suponiendo, por defecto, un valor de LMR de 10 ng g⁻¹.

7.2.2. Directiva Marco Sobre Aguas 2000/60/CE (DMA)

Los residuos de ciertos pesticidas también fueron regulados en distintos compartimentos medioambientales. En concreto, con la entrada en vigor de la **Directiva Marco 2000/60/CE**, se estableció un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas, con la regulación de la situación de control de residuos en aguas a nivel europeo [37], relacionando el concepto de contaminante del agua con el riesgo que implica para la salud humana y los ecosistemas.

A principios de los años setenta, altos niveles de contaminación química responsables de frecuentes muertes de peces en algunos ríos de Europa fueron los desencadenantes para que surgiera una regularización de las sustancias peligrosas vertidas en el medio acuático. Se estableció de esta forma la **Directiva 76/464/CEE** con la que se pretendía regular la contaminación de aguas superficiales, territoriales, costeras y subterráneas para cientos que compuestos químicos utilizados en Europa. Desde 1980 se aplicó la **Directiva 80/68/CEE**

relativa a la protección de aguas subterráneas contra la contaminación causada por determinadas sustancias, en donde se agrupaban los contaminantes químicos en dos listas, una compuesta por sustancias consideradas especialmente tóxicas, persistentes y bioacumulables que debían regularse por la Comunidad Europea y una segunda formada por sustancias menos problemáticas, que se dejó en manos de los Estados miembros. Se fijó el objetivo de eliminar y prohibir los vertidos de las sustancias pertenecientes a la lista I y limitar el de las pertenecientes a la lista II.

Durante el tiempo transcurrido desde que se adoptó esta política, la Dirección General de Medio Ambiente de la Comisión publicó varios informes sobre su aplicación, y a pesar de los resultados positivos en cuanto a la reducción de la contaminación de fuentes industriales, se observaron algunos problemas en la puesta en práctica, puesto que el proceso legislativo resultó muy lento.

Se reconsideró entonces la aplicación de una **política sobre prevención y control integrados de la contaminación** (IPPC - Integrated Prevention and Pollution Control). En 1996, se adoptó la **Directiva IPPC**, basada en el marco regulador de la Directiva 76/464/CEE, aunque solo se refiere a ciertas disposiciones de la misma. Fundamentada igualmente en la Directiva 76/464/CEE, surge la propuesta de **Directiva Marco sobre aguas 2000/60/CE**, basada en el concepto de control integrado de la contaminación, contribuyendo a racionalizar y simplificar la legislación ambiental.

Mediante esta Directiva marco, la Unión Europea organiza la gestión de las masas de agua superficiales, continentales, de transición, aguas costeras y subterráneas, con el fin de prevenir y reducir su contaminación, fomentar su uso sostenible, proteger el medio acuático, mejorar la situación de los ecosistemas acuáticos y paliar los efectos de las inundaciones y de las sequías. Para ello, los estados miembros estarán obligados a cesar gradualmente las descargas, emisiones y pérdidas de sustancias peligrosas prioritarias en los acuíferos de superficie, y a lograr la reducción progresiva de las descargas de sustancias prioritarias.

7.2.2.1. Sustancias prioritarias en aguas superficiales.

El artículo 16 de la Directiva marco de aguas establece una *estrategia para combatir la contaminación química del agua*, para lo cual se constituyó como primera medida una lista de sustancias prioritarias peligrosas (**Decisión 2455/2001/CE**) compuesta por 33 grupos de sustancias de interés prioritario dentro de los Estados Miembros [38]. Tal y como se especifica en el artículo 3 de la Decisión 2455/2001/CE, *la lista de sustancias prioritarias adoptada [...] sustituye a la lista [...] relativa a sustancias peligrosas que podrían incluirse en la lista I de la Directiva*

76/464/CEE del Consejo. Algunas de estas sustancias se clasificaron como sustancias peligrosas prioritarias y posiblemente prioritarias, y se estableció un plan de actuación para proceder a la interrupción o supresión gradual de los vertidos, emisiones y pérdidas de las mismas.

Esta medida se adoptó junto con la propuesta de **normas de calidad ambiental (NCA)** y de **controles de emisión** para los contaminantes clasificados como sustancias prioritarias para garantizar la protección del medio acuático [39]. A tal efecto, la Comisión Europea propuso en 2008 las Normas de Calidad Ambiental (**NCA**) en el ámbito de la política de aguas establecidas en el anexo I de la **Directiva 2008/105/CE**. Las propuestas incluidas en este documento establecen limitaciones en cuanto a la **concentración máxima admisible (CMA)** y la **concentración media anual (MA) para 41 sustancias químicas peligrosas** puestas bajo control en aguas superficiales, que presentan un riesgo para la vida animal y las plantas del medio acuático y para la salud humana (33 sustancias prioritarias y otros 8 contaminantes seleccionadas principalmente sobre la base de su toxicidad, persistencia y bioacumulación, existentes en la lista I de la Directiva 76/464/CEE). Además, se establece en el anexo III de esta directiva, un segundo listado de 8 *sustancias sometidas a revisión para su posible identificación como sustancias prioritarias o como sustancias peligrosas prioritarias*.

7.2.1.3. Desarrollo de metodologías analíticas en base a la Directiva Marco Sobre

Aguas.

La **Directiva 2009/90/CE**, aplicable desde el 21 de Agosto de 2009, *establece las especificaciones técnicas del análisis químico y del seguimiento del estado de las aguas* conforme a la Directiva 2000/60/CE, con el objetivo de fijar criterios de funcionamiento comunes para el análisis de aguas, sedimentos y biota llevados a cabo por los Estados Miembros, así como establecer normas dirigidas a demostrar la calidad de los resultados analíticos [40].

El desarrollo de esta Tesis en lo relativo al análisis de **aguas superficiales**, se ha llevado a cabo en concordancia a las especificaciones anteriores y en base a los valores de concentración estipulados en las NCA. Se muestran a continuación los correspondientes a los 10 pesticidas legislados.

Tabla I.A.9. Normas de calidad ambiental establecidas para los 10 pesticidas legislados [41]

Compuestos	Media Anual (NCA-MA) ng mL⁻¹	Concentración Máxima Admisible (NCA-CMA) ng mL⁻¹
Alacloro	0,3	0,7
Atrazina	0,6	2,0
Clorfenvinfós	0,1	0,3
Clorpirifós	0,03	0,1
Diurón	0,2	1,8
Endosulfán ¹	0,005	0,01
Hexaclorociclohexano ¹	0,02	0,04
Isoproturón	0,3	1,0
Simazina	1,0	4,0
Trifluralina	0,03	No aplicable ²

¹ Sustancias identificadas como sustancias peligrosas prioritarias.

² Para este caso se considera que el valor de NCA-MA protege contra la contaminación a corto plazo en el caso de los vertidos continuos, ya que son significativamente inferiores a los valores calculados sobre la base de la toxicidad aguda.

De los anteriores, tanto el endosulfán como el hexaclorociclohexano se identifican como sustancias peligrosas prioritarias mientras que el resto de plaguicidas recogidos en la directiva se clasifican como sustancias prioritarias, y han sido objeto de estudio en la Tesis que se presenta junto con 47 compuestos más evaluados en aguas superficiales, entre los que está la bentazona, incluida en la lista de las 8 sustancias sometidas a revisión.

Tres de las sustancias presentadas en la tabla anterior (Clorfenvinfós, diurón e isoproturón) están todavía incluidas en el anexo I de la **Directiva 91/414/CE** que regula el comercio de agroquímicos, por lo que su comercialización no está restringida y pueden utilizarse para la protección de cultivos.

7.2.3. Estrategia Temática para la Protección del Suelo

La **Estrategia Temática para la Protección del Suelo** de la Unión Europea (**COM (2006) 231**) propone medidas cuyo objeto es la protección del suelo y la preservación de su capacidad de desempeñar sus funciones ecológicas, económicas, sociales y culturales

modificando la **Directiva 2004/35/CE** referente a la responsabilidad medioambiental en relación con la prevención y reparación de daños medioambientales.

Varias políticas comunitarias contribuyen a la protección del suelo, especialmente la política de medio ambiente y la política agrícola. No obstante, las disposiciones adoptadas en estos entornos legales a favor de la protección del suelo no constituyen un marco legal sólido y coherente, centrado en la protección del mismo. Solamente en la Directiva sobre responsabilidad medioambiental (2004/35/CE) se establece un marco armonizado de actuación para aquellos casos en que la contaminación del suelo provoque un riesgo grave para la salud humana, aunque no se aplica a los fenómenos de contaminación antiguos o a los daños previos a su entrada en vigor [42].

Por todo ello la Comisión Europea ha planteado en base a la Estrategia Temática de Suelo (COM(2006)231), una propuesta de Directiva Marco de Suelo (COM(2006)232) que se prevé sea aplicable en torno al 2016, puesto que se ha establecido un período de 10 años como período de actuación legislativa al respecto por parte de la Comisión. El propósito de dicha Directiva es el de proteger y evaluar la contaminación de los suelos considerando imprescindible **promover la protección del suelo** mediante una estrategia global que debería tener en cuenta las distintas **funciones que puede ejercer el suelo**, su variabilidad y su complejidad en cuanto a su **composición**, así como el conjunto de **procesos de degradación** que puede sufrir, sin omitir los aspectos socioeconómicos. La Comisión propone tanto **prevenir la degradación del suelo y conservar sus funciones**, como **restaurar el suelo degradado** para devolverle un nivel de funcionalidad que corresponda al menos a su utilización actual y prevista [43].

La propuesta de Directiva COM (2006) 231 dispone que los Estados miembros tomen las medidas adecuadas para prevenir la contaminación del suelo por sustancias peligrosas. Actualmente, nueve de ellos disponen de una legislación específica al respecto. En España, con la aplicación del **Real Decreto 9/2005** se introdujo una regulación y control relativos a la contaminación en este compartimento medioambiental.

Se definen en este Real Decreto las **actividades potencialmente contaminantes del suelo** como aquellas actividades de tipo industrial o comercial que, *ya sea por el manejo de sustancias peligrosas ya sea por la generación de residuos, pueden contaminar el suelo*; por otra parte, se entiende por **suelo contaminado**, *aquel cuyas características han sido alteradas negativamente por la presencia de componentes químicos de carácter peligroso de origen humano, en concentración tal que comporte un riesgo inaceptable para la salud humana o el medio ambiente* [44].

Así mismo, se establecen en los distintos anexos la relación de actividades susceptibles de causar contaminación en el suelo, y los criterios y estándares que permiten decidir si un

suelo está o no contaminado, incluyendo los requisitos técnicos. En el anexo V y VI se incluyen dos listados de **contaminantes y niveles genéricos de referencia** para protección de la salud humana y del medioambiente, respectivamente, en función del uso del suelo. De esta forma, se establece que un suelo se puede considerar como contaminado cuando se determine la presencia de alguna de las sustancias incluidas en la lista de contaminantes establecida que representen *riesgos inaceptables para la protección de la salud humana o los ecosistemas*. En su mayoría, estos compuestos son pesticidas organoclorados y compuestos aromáticos [44].

8. PESTICIDAS ESTUDIADOS EN ESTA TESIS.

Los estudios realizados a lo largo del desarrollo de esta Memoria se centran en dos ejes: por una parte se ha desarrollado un estudio a nivel de **seguridad alimentaria** con el análisis de residuos en muestras de **leche** y muestras de **miel y polen**. La segunda área de estudio es la relativa a **matrices medioambientales**, centrada en la determinación de residuos de pesticidas en muestras de **agua** y el planteamiento de las directrices de estudio relativas a muestras de **suelos agrícolas**. Se muestra a continuación una lista con los **74 compuestos estudiados**, indicando cuales fueron analizados en cada una de las investigaciones desarrolladas.

Tabla I.A.10. Pesticidas estudiados por matriz.

	MATRICES					MATRICES			
	Leche	Miel y polen	Agua	Suelo		Leche	Miel y polen	Agua	Suelo
2,4-D									
Acetocloro									
Alacloro									
Atrazina									
Bifentrina									
Bioaletrina									
Bentazona									
Bromacil									
Bromoxinil									
Carbetamida									
Cianazina									
Cifenotrina									
Cipermetrina									
Clorfenvinfós									
Cloridazón									
Cloroxurón									
Clorpirifós									
Clortolurón									
DEA									
DETBA									
DIA									
Diazinón									

	MATICES			
	Leche	Miel y polen	Agua	Suelo
Diclorprop				
Dimefurón				
Dimetanamida-P				
Dinoterb				
Diurón				
Empentrina				
Etidimurón				
Etofumesato				
Fenitrotión				
Fipronil				
Fipronil desulfinil				
Fipronil carbixamida				
Fipronil sulfona				
Fipronil sulfuro				
Fluacifop				
Fluoxipir				
Fosalona				
Haloxifop				
Imidacloprid				
Ioxinil				
Isoproturón				
λ-Cihalotrina				
Linurón				
Luferunón				
MCPA				

	MATICES			
	Leche	Miel y polen	Agua	Suelo
Malatión				
Metabenzthiazurón				
Mecoprop				
Metabromurón				
Metalaxil				
Metamitrona				
Metazacloro				
Metoxurón				
Metil clorpirifós				
Metil pirimifós				
Metolacloro				
Mevinfós				
Monolinurón				
Permetrina				
Prometrina				
Propazina				
Quinmerac				
Simazina				
Sulcotriona				
Teflutrina				
Terbutilazina				
Terbutrina				
Tiametoxam				
Tetrametrina				
Transflutrina				
Triadimefón				
Triazofós				

9. BIBLIOGRAFÍA.

- [1] Real Decreto 443/1994, BOE nº30, Ministerio de Presidencia, Madrid, **1994**.
- [2] Real Decreto 3349/1983, BOE nº20, Ministerio de Presidencia, Madrid, **1983**.
- [3] Real Decreto 162/1991, BOE nº40, Ministerio de Presidencia, Madrid, **1991**.
- [4] Directrices para los certificados fitosanitarios. Normas internacionales para medidas fitosanitarias; FAO (Roma)- 12, **2001**.
- [5] Morell, I.; Candela, L. “Plaguicidas. Aspectos ambientales, analíticos y toxicológicos”; Publicacions de la Universitat Jaume I (Castelló), **1998**, pp 273 –295.
- [6] Tadeo, J.; Sánchez-Brunete, C.; González, L.; *Pesticides: Classification and Properties*. En “Analysis of Pesticides in Food and Environmental Samples”; Tadeo, J.; Ed. CRC Press, **2008**; pp. 1-34.
- [7] Labrada, R.; Caseley, J.; Parker, C; “Manejo de malezas para países en desarrollo”; FAO, (Roma) **1996**.
- [8] “World Health Organization, The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification : 2004” World Health Organization, **2005**.
- [9] Georghiou, G.; *The Magnitude of the Resistance Problem*. En “Pesticide Resistance: Strategies and Tactics for Management” Committee on Strategies for the Management of Pesticide Resistant Pest Populations; National Academy Press (Washington D.C., USA), **1986**, pp. 14-44.
- [10] Altieri, M.; *Agroecology: “The science of sustainable agriculture”*. Ed. Westview Press, (Boulder, USA) **1996**.
- [11] Duke, S.; “Herbicide-resistant crops: agricultural, environmental, economic regulatory, and technical aspects”; Lewis Publishers, (Boca Raton, USA), **1996**, pp. 1-13.
- [12] Barriuso, E.; “*Comportamiento de pesticidas en los suelos : consecuencias medio-ambientales y evaluación de riesgos de contaminación*”. Ponencia en seminario “Prevención da contaminación das augas por actividades agrarias”, Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo” (A Coruña, España), **9-11-2006**.

[13] Oades, J.; *Reacciones de superficie: adsorción e intercambio iónico*. En: “Edafología para la agricultura y el medio ambiente”; Porta, J.; López-Acevedo, M.; Roquero, C.; Ed. Mundi-Prensa; **2003**, pp.227-247.

[14] Julca-Otiniano, A.; Meneses-Florián, L.; Blas-Sevillano, R.; Bello-Amez, S.; Organic matter, importance, experiences and it role in agriculture; *Idesia*; 24, 2006, pp. 49-61.

[15] Gustafson, D.J (1989). Ground ubiquity score: A simple method for assessing pesticide leachability. *Environmental toxicol. And Chem.*; 8, 1989, 339-357.

[16] European Crop Protection Association. Review 2001-2002. <http://www.ecpa.be/files/ecpa/documentslive/22/12887_ECPA%20Annual%20Report%202003.PDF> (consulta: 14-01-10)

[17] FAOSTAT - Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) <<http://faostat.fao.org/site/424/default.aspx#ancor>> (consulta: 14-01-10)

[18] Council Directive 91/414/EEC of 15 July 1991 concerning the placing of plant protection products on the market; *Off. J. Eur. Comm*; L 230 de 19/08/1991 p. 0001 – 0032.

[19] Council Decision 2006/730/EC of 25 September 2006 on the conclusion, on behalf of the European Community, of the Rotterdam Convention on the Prior Informed Consent Procedure for certain hazardous chemicals and pesticides in International trade. *DO L 299 de 28.10.2006, p. 23/25*.

[20] Regulation (EC) N° 689/2008 of the european parliament and of the council of 17 June 2008 concerning the export and import of dangerous chemicals; *Off. J. Eur. Comm*; L 204 , 31/7/2008 pp 1-35.

[21] Convenio de Rotterdam: Lista PIC de sustancias < <http://www.pic.int/home.php?type=t&id=29&sid=30>> (Consulta: 08-04-2010)

[22] Dirty Dozen List. Pesticides Action Network International <<http://www.pan-international.org>> (Consulta: 08-04-2010)

[23] Van Der Meulen, B., Van Der Velde, M.; “Food safety law in the European Union. An introduction”; Wageningen Academic Publishers (Wageningen, The Netherlands), **2004**.

[24] Council Directive 96/23/EC of 29 April 1996 on measures to monitor certain substances and residues thereof in live animals and animal products and repealing Directives 85/358/EEC and 86/469/EEC and Decisions 89/187/EEC and 91/664/EEC, *Off. J. Eur. Comm.*, L125/10, **1996**.

[25] Report from the Commission to the European Parliament and to the Council on the application of Regulation (EC) No 882/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004.

[26] “White paper on Food Safety”. European Commission. Brussels. 2000.

[27] European Food Safety Authority (EFSA) <http://www.efsa.europa.eu/> (consulta: 16-01-10)

[28] World Health Organization (WHO). International Programme on Chemical Safety <<http://www.who.int/ipcs/food/jmpr/en/>> (Consulta: 14-01-10).

[29] Codex Committee on Pesticide Residues (CCPR). <<http://www.codexalimentarius.net>> (Consulta: 14-01-10).

[30] Gateway to the European Union: Plant Protection: Pesticide Residues <http://ec.europa.eu/food/plant/protection/pesticides/regulation_ec_396_2005_en.htm> (consulta: 15-01-10).

[31] Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council of 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/EEC.

[32] Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council of 7 May 2002 on undesirable substances in animal feed, *Off. J. Eur. Union*, L140/10, **2002**.

[33] Commission Regulation (EC) No. 839/2008 amending Regulation (EC) No. 396/2005 of the European Parliament and of the Council as regards Annexes II, III and IV on maximum residue levels of pesticides in or on certain products. *Off. J. Eur. Union*, L 234, 30 August 2008, pp. 1-216.

[34] **Commission Decision 97/747/EC** of 27 October 1997 fixing the levels, frequencies of sampling provided for by Council Directive 96/23/EC for the monitoring of certain substances, residues thereof in certain animal products; *Off. J. Eur. Comm*, L 303, **1997**

[35] Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods, the interpretation of results, *Off. J. Eur. Comm.*, L 221, 2002, pp. 8 - 36.

[36] EU Pesticides database <http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm> (Consulta: 02-05-2010).

[37] Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy; *Off. J.*; L 327 , 2000 P. 0001 – 0073.

[38] Decision No. 2455/2001/EC of the European Parliament and of the Council establishing the list of priority substances in the field of water policy and amending Directive 2000/60/EC, *Off. J. Eur. Comm.*; L 331, 2001, pp. 1-5.

[39] Prevención y control integrados de la contaminación química de las aguas superficiales en la Unión Europea. Comunicación de la comisión al consejo y al parlamento europeo <<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=COM:2006:0398:FIN:ES:PDF>> (Consulta: 08-04-2010)

[40] Commission Directive 2009/90/EC laying down, pursuant to Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council, technical specifications for chemical analysis and monitoring of water status.; *Off. J. Eur. Union. L 201, 2009, pp. 36-38.*

[41] Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on environmental quality standards in the field of water policy; *Off. J. Eur. Comm.*, L 348 , 2008 pp. 84 - 97.

[42] Communication from the Commission to the Council, the European Parliament, the European Economic and Social Committee and the Committee of the Regions - Thematic Strategy for Soil Protection [SEC(2006)620] [SEC(2006)1165] <<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=COM:2006:0231:FIN:EN:PDF>> (Consulta: 08-04-2010).

[43] Proposal for a Directive of the European Parliament and of the Council establishing a framework for the protection of soil and amending Directive 2004/35/EC <<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=COM:2006:0232:FIN:EN:PDF>> (Consulta: 10-04-2010).

[44] Ministerio de la Presidencia de España. Real Decreto 9/2005, de 14 de enero, por el que se establece la relación de actividades potencialmente contaminantes del suelo y los criterios y estándares para la declaración de suelos contaminados. BOE 15/2005, pp. 1833-1843.

I.B. DISPOSITIVOS DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN UTILIZADOS

1. CROMATÓGRAFO DE GASES GC-MS/MS. POLARIS Q.	46 -
2. CROMATÓGRAFO DE LÍQUIDOS	48 -
2.1. DETECTOR DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE TRIPLE CUADRUPOLO TSQ QUANTUM	49 -
2.1.1 Principios básicos	49 -
2.1.2. Zona de presión atmosférica. Fuente de ionización (HESI).....	49 -
2.1.3. Zona de presión intermedia. Óptica iónica (Q0 y Q00)	51 -
2.1.4. Zona de baja presión. Analizador de triple cuadrupolo.....	52 -
2.1.5. Sistema de detección.	53 -
2.2. MODOS DE DETECCIÓN QUE PERMITE EL QUANTUM ACCESS	53 -
2.2.1. Full Scan (Barrido de iones)	53 -
2.2.2. SIM (Monitorización de un solo ión)	54 -
2.2.3. SRM (Monitorización de reacciones selectivas)	54 -
2.2.4. Full MS/MS (Barrido de fragmentos MS ²)	54 -
2.2.5. QED (Quantitative-Enhanced Data-Dependent Scan).....	55 -
3. BIBLIOGRAFÍA	56 -

Para la realización del trabajo presentado se ha recurrido a la cromatografía de gases y la cromatografía líquida de alta resolución. En ambos casos se ha trabajado con dispositivos que pertenecen a la casa comercial **Thermo Fisher Scientific**. El cromatógrafo de líquidos dispone de un detector de masas **TSQ Quantum Access** de triple cuadrupolo, mientras que el cromatógrafo de gases está acoplado a un detector **Polaris Q**, que dispone de una trampa de iones en 3D con una fuente de ionización externa.

En los apartados sucesivos se describe brevemente las posibilidades del detector Polaris Q en cuanto a ionización y detección. Sin embargo, en este capítulo se analiza de una forma práctica el funcionamiento del detector de triple cuadrupolo TSQ Quantum Access haciendo especial hincapié en las posibilidades a nivel de adquisición y las ventajas que representa la novedosa distribución ortogonal de los tres cuadrupolos que utiliza el dispositivo.

1. CROMATÓGRAFO DE GASES GC-MS/MS. POLARIS Q.

La detección analítica de los compuestos utilizando el cromatógrafo de gases se produce a partir de la ionización de los analitos que llegan a la zona de detección a través de la línea de transferencia (parte final de la columna cromatográfica que entra en la zona de ionización, que se encuentra a vacío).

Los analitos son depositados en el volumen de ionización en donde se lleva a cabo la formación de iones, bien por impacto electrónico (EI, del inglés *Electronic Impact*), o bien por ionización química (CI, del inglés *Chemical Ionization*)

EI – La fuente de EI utiliza una corriente de electrones, generada normalmente por un filamento de tungsteno, para arrancar otro electrón de átomos o moléculas en fase gas, produciéndose la ionización de los compuestos que más tarde serán aislados y fraccionados.

CI – Los iones se producen con la colisión del analito con los iones de un gas reactivo, en este caso metano, que se hace llegar a la fuente de ionización. Puede trabajar en modo positivo y negativo, lo cual supone un especial interés en el caso de compuestos que no generan iones positivos con facilidad (los grupos ácidos o los elementos electronegativos). El metano está presente en la fuente en una proporción muy alta con respecto al analito. Las colisiones de moléculas de este gas entre sí producen iones que arrancan un electrón o un protón (H^+) de los analitos en fase gas

que llegan a la fuente, produciéndose de esta forma la ionización de los compuestos separados en la columna cromatográfica.

Los iones formados en la fuente de ionización pasan a la trampa de iones a través de una serie de lentes que actúan como filtros, puesto que se aplica un potencial que supone la transmisión de iones con un m/z determinado. Aquellas moléculas que no han sido ionizadas en la fuente, se eliminan del volumen de ionización por efecto del vacío.

Una vez en la trampa, se produce la selección de los iones de interés a través de la aplicación de un campo eléctrico dentro del cual ciertos iones describen un movimiento que los mantiene estabilizados en el interior de la misma, mientras que el resto colisionan con la paredes de la trampa eliminándose. Se produce entonces la fragmentación por colisión con helio y las partículas generadas son enviadas a la zona de detección.

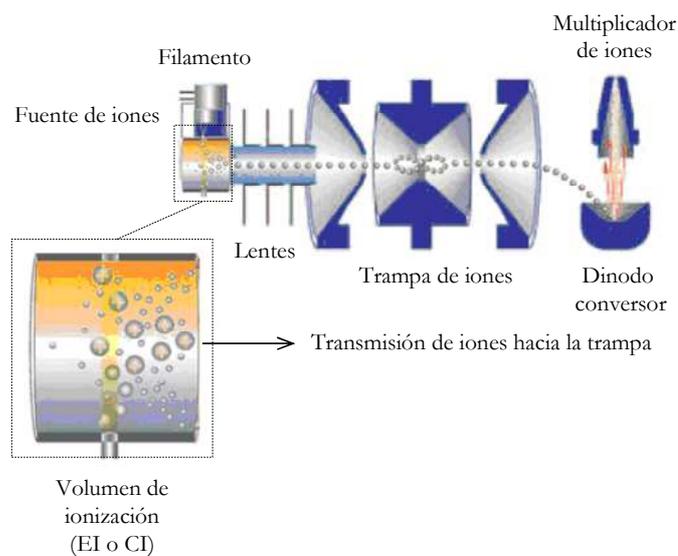


Figura I.B.1. Esquema de la trampa de iones

La gran ventaja que representa el hecho de que la ionización se produzca en la fuente externa que posee el Polaris Q es que la manipulación de esta zona del dispositivo se puede llevar a cabo sin romper el vacío, extrayendo el volumen de ionización con ayuda de una guía metálica.

2. CROMATÓGRAFO DE LÍQUIDOS

A continuación se presentan las partes básicas que componen este equipo

- Automuestreador ACCELA
- Cromatógrafo de líquidos HPLC
- Bomba de impulsión de fase móvil
- Puerto de inyección
- Horno y la columna cromatográfica
- Detector de masas de triple cuadrupolo TSQ Quantum
 - Fuente de ionización
 - Capilar
 - Vaporizador
 - Cono de entrada
 - Analizador
 - Óptica iónica: Lentes y cuadrupolos de entrada (Q0 y Q00)
 - Sistema de triple cuadrupolo
 - Detector multiplicador de electrones.



Figura I.B.2 Cromatógrafo de líquidos.

Creo que resulta conveniente hacer una breve introducción para poder entender cómo funciona este detector y poder comprender mejor los aspectos relativos a la identificación y detección de los analitos que se detalla a lo largo del capítulo IV de esta memoria.

2.1. DETECTOR DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE TRIPLE CUADRUPOLO TSQ QUANTUM

2.1.1 Principios básicos

El detector de masas utilizado consta de 4 partes básicas: una fuente de ionización a presión atmosférica, la zona de óptica iónica, el analizador (que contiene los tres cuadrupolos) y el sistema de detección formado por un dinodo y un multiplicador.

Desde que la fase móvil con los analitos llega a la fuente de ionización, se producen una serie de procesos mediante los cuales los compuestos se ionizan y pasan a fase gaseosa para viajar a través de las distintas partes del analizador (cuerpo del interior del espectrómetro que guía los analitos desde la fuente de ionización), hasta que, sin tocar ninguna de las partes sólidas del sistema, llegan a la zona de detección formada por un dinodo de conversión y un multiplicador de electrones que amplifica la señal.

El sistema está sometido a un gradiente de presión desde la fuente (a presión atmosférica) pasando por las distintas zonas del analizador hasta el detector, en donde hay un vacío del orden de 10^{-5} Torr), generado por dos bombas: una turbomolecular apoyada por otra bomba rotatoria mecánica de alto vacío.

2.1.2. Zona de presión atmosférica. Fuente de ionización (HESI).



Figura I.B.3 Fuente de ionización

Los espectrómetros de masas requieren una fuente de ionización en donde generar iones. Hay varios sistemas de ionización disponibles, y en este caso se ha trabajado con un sistema de ionización a presión atmosférica (API). Los iones producidos en la fuente se transmiten al analizador en donde son separados de acuerdo a su proporción masa/carga (m/z) aplicando distintos voltajes, para alcanzar el detector en donde la señal se amplifica, se registra y se transforma en un pico cromatográfico.

En este trabajo se ha utilizado la fuente de ionización **ESI** (**Electrospray Ionization**), más versátil que APCI, adecuada para realizar el análisis de compuestos polares y que permite la posibilidad de aplicar calor, en cuyo caso se habla de **HESI** (del inglés **Heated**

Electrospray Ionization).

El electrospray es un proceso de ionización suave que transforma iones en solución, en iones en fase gaseosa en un proceso que se lleva a cabo en tres etapas [1-4].

En un primer paso, los compuestos disueltos en una fase móvil más volátil, pasan a través de un capilar al que se le aplica un voltaje, produciéndose la ionización de las moléculas. Se forman cationes o aniones dependiendo de la polaridad del voltaje aplicado denominándose el proceso en cada caso como **modo de ionización positivo o negativo**. A la salida de este capilar, por efecto de la repulsión entre cargas eléctricas, se forma un aerosol que contiene gotas altamente cargadas, la mayoría de ellas con la misma polaridad que se aplicó en el capilar.

Una segunda etapa es la eliminación del disolvente para pasar a fase gaseosa. Entre los mecanismos postulados para explicar este fenómeno, está el del modelo de carga-residuo, por el cual se supone que las gotas formadas a la salida del capilar reducen su tamaño por volatilización, de forma que la densidad de carga aumenta hasta un punto crítico (conocido como límite de estabilidad de Rayleigh) en donde la repulsión electrostática entre las cargas hace que primero se dividan en gotas más pequeñas que acabarán explotando cuando los iones agolpados en la superficie de éstas presenten unas repulsiones por fuerzas de Coulomb demasiado altas, expulsándose así iones en fase gas.

La formación del spray se ve mejorada usando dos flujos de gas (N_2) aplicados de forma coaxial. El primero, denominado **gas envolvente**, ayuda a pulverizar la solución de muestra a la salida del capilar. Los iones producidos salen del capilar a un vaporizador en donde una segunda corriente de nitrógeno (**gas auxiliar calentado**), gira en espiral y ayuda al gas envolvente en la desolvatación de las moléculas cargadas.

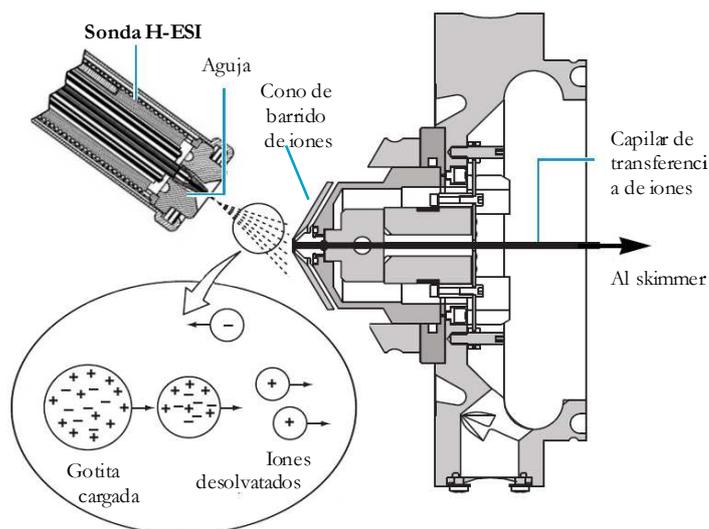


Figura I.B.4 Esquema del funcionamiento de la fuente de ionización H-ESI

Se obtiene de esta forma la nebulización de la solución que entra en la fuente de ionización. Los analitos en forma iónica y fase gaseosa pasan de la zona de presión atmosférica (fuente de ionización) a la zona de baja presión (interior del masas) por efecto de la diferencia de potencial establecido entre el capilar y el cono de entrada al analizador y viajan por las zonas de éste, guiados y enfocados a través de distintas lentes hacia el interior del detector gracias a la aplicación de campos eléctricos adecuados.

2.1.3. Zona de presión intermedia. Óptica iónica (Q0 y Q00)

Una vez traspasado el cono de entrada al inyector, los iones son conducidos a través del capilar de transferencia de iones hasta la zona de óptica iónica formada por un conjunto de lentes, que actúan como electrodos, y un pequeño cuadrupolo (Q00), seguido de un octapolo (Q0). En todo este sistema se produce un gradiente de presión para suavizar el paso de los iones que vienen de la fuente (a presión atmosférica) y se dirigen al analizador, que se encuentra a 10^{-5} Torr. Este efecto se logra gracias a la existencia de una zona denominada *skimmer* que actúa como amortiguadora de vacío.

La función de esta zona de óptica iónica es doble. Por un lado se lleva a cabo una criba de las partículas que se transfieren al siguiente punto y se aumenta la sensibilidad de la detección deshaciendo clusters e inductos gracias a la existencia de una corriente de gas en sentido contrario a la entrada de los analitos. Por otro lado se imprime energía cinética a los iones para que los choques en la celda de colisión sean más efectivos.

La polaridad de los potenciales aplicados en las distintas partes del sistema determina qué iones traspasarán esta zona para llegar al analizador. Si el voltaje aplicado en esta zona es alto se puede dar una situación en donde se produzca un fenómeno denominado *disociación inducida por colisión de iones* (SID) que disminuye la sensibilidad analítica debido a la fragmentación temprana de los iones.

En esta zona existen multitud de parámetros que pueden ser optimizados y de ellos dependerá la cantidad de iones que pasan al analizador. Además es la parte del sistema en donde se producen más pérdidas así como en donde se eliminan más interferencias [1].

2.1.4. Zona de baja presión. Analizador de triple cuadrupolo.

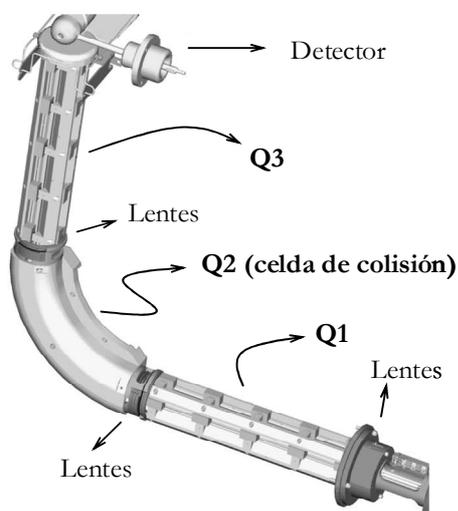


Figura I.B.5 Esquema del analizador de triple cuadrupolo

Los iones que han traspasado la zona de óptica iónica llegan al analizador en donde viajan a través de 3 cuadrupolos que están sometidos a vacío, atravesando diversas lentes que ayudan a seleccionar las partículas de interés.

El primero y el último de los cuadrupolos (Q1 y Q3, ambos con sistema HyperQuad) pueden actuar como transmisores de iones o analizadores de masas, dependiendo del tipo de análisis que se quiera llevar a cabo. El cuadrupolo intermedio (Q2) solamente se utiliza como transmisor de iones y constituye la celda de colisión del analizador en donde se fragmentan los iones que llegan de Q1, pasan a Q3 y se dirigen al detector. La fragmentación se produce gracias a la presencia de una corriente de Argón que choca contra los iones rompiéndolos en fragmentos que llegan al detector.

El movimiento dentro de los cuadrupolos se produce debido a un intercambio de polaridades entre las 4 barras que lo conforman, en donde se aplica una corriente alterna de longitud de onda en la zona de la radiofrecuencia y una corriente continua, creando un campo electrostático en donde solamente se producen oscilaciones estables para iones con un m/z específico. De esta forma el ión, aspirado por el vacío, describe un movimiento en espiral en el interior del cuadrupolo mientras viaja hacia el detector. Aquellos iones que no son estables dentro del campo electrostático creado chocan con las paredes del cuadrupolo o son aspirados y se eliminan de forma que no llegarán nunca al detector.

Dado que Q2 tiene forma curva, Q1 se encuentra en perpendicular a Q3, presentando una **distribución ortogonal** dentro del analizador. Esta disposición ayuda a eliminar las partículas que pueden interferir en el análisis y permite la **eliminación del llamado efecto "cross talk"** [5]: en muchas ocasiones, cuando se realiza un estudio multirresiduo es necesario utilizar tiempos de escaneo muy bajos (10-20 ms) dado que el número de transiciones a determinar es muy elevado. Por otra parte, es común que los estudios se centren en familias de compuestos químicos que debido a su proximidad estructural pueden coeluir y fraccionar de forma común. Es posible que estos iones producto se almacenen en la celda de colisión

provocando una incorrecta cuantificación por efecto cross-talk (es decir vincular un fragmento de un compuesto a otro que presenta el mismo ión producto y se coeluye con el primero).

2.1.5. Sistema de detección.

El sistema de detección está formado por un dinodo de conversión que, a partir del choque con los iones que llegan desde el analizador, emite partículas secundarias (electrones, partículas neutras, e iones de carga inversa a los iones que llegan al detector), que son dirigidas mediante una diferencia de potencial hacia el multiplicador de electrones, en donde las partículas que llegan generan electrones (los arrancan de la pared del multiplicador originando un efecto en cascada que amplifica la señal). Todas estas partículas generadas chocan en un ánodo produciendo una señal eléctrica que es la que se registra en forma de pico cromatográfico.

2.2. MODOS DE DETECCIÓN QUE PERMITE EL QUANTUM ACCESS

La combinación de los cuadrupolos actuando en modo de transmisor de iones o analizador de masas proporciona una serie de determinaciones posibles que se pueden llevar a cabo con el Quantum Access. La transmisión de iones se consigue aplicando voltajes de radiofrecuencia, mientras que la fragmentación se logra al aplicar corriente continua al sistema. De esta forma en función del tipo de corriente que se aplique, se logra la transmisión de los iones generados en la fuente, o bien la fragmentación y transmisión de los fragmentos de los iones. Además si en la celda de colisión no existe una corriente de Argón que choque con las partículas, no se producirá tampoco la fragmentación de las mismas.

2.2.1. Full Scan (Barrido de iones)

En este caso los tres cuadrupolos se encuentran en modo de transmisión de iones y se hace un barrido de potencial dentro de un rango de m/z . De esta forma, todos los iones producidos en la fuente, con m/z dentro del rango fijado, llegan al detector, puesto que en la celda de colisión no ocurre más fenómeno que el transporte de los iones.

2.2.2. SIM (Monitorización de un solo ión)

En este caso en los iones producidos en la fuente llegan a Q1, en donde se aplica un voltaje de forma que **solamente los iones seleccionados pasan a Q2**, y de ahí a Q3, generando el espectro de SIM del compuesto en donde se refleja la m/z de los iones y la intensidad de los mismos. Este modo de detección resulta más selectivo que el anterior, si bien se pierde mucha información a nivel espectral y es más fácil caer en el error de los falsos positivos.

2.2.3. SRM (Monitorización de reacciones selectivas)

Con este modo de análisis, se monitoriza una reacción particular o grupo de reacciones como la fragmentación o la pérdida de una fracción neutra de la partícula. De esta forma, se selecciona un ión padre que será fragmentado en un ión hijo en un proceso definiendo una **transición del compuesto** al que pertenece dicho ión padre. Se mejora por lo tanto la selectividad con respecto al modo SIM puesto que, no solamente se selecciona un ión en Q1, sino que ese ión se fragmenta en la celda de colisión atravesando Q2, y en Q3 se dejan pasar solamente aquellos iones hijos que tienen la m/z especificada y que provienen del ión seleccionado en Q1. De este forma, si existe una interferencia con el analito de interés, que presente la misma m/z , llegará a Q2, en donde se fragmentará de forma distinta y se perderán esos fragmentos en Q3.

2.2.4. Full MS/MS (Barrido de fragmentos MS²)

En este caso se lleva a cabo un barrido de fragmentos de MS/MS a partir de los iones producidos en la fuente. Para ello, al igual que ocurre en el primer paso del modo SRM, los iones producidos en la fuente, que llegan a Q1 se someten a un campo eléctrico de forma que aquellos que son estables, son transportados hasta Q2, en donde se fragmentan. En este punto, en Q3 se aplica una técnica de escaneado denominada RER (del inglés *Reversed Energy Ramp*) que consiste en la variación lineal de las energías de colisión aplicadas de mayor a menor valor, mientras que realiza un escaneado de masas desde valores m/z bajos a altos.

Para una misma presión de gas, los productos generados en una primera fragmentación (productos con m/z mayores) necesitan de energías de colisión menores para fragmentarse de nuevo, mientras que los iones de m/z bajo (normalmente de segunda o tercera fragmentación) necesitan de valores de energías de colisión más altos. Por esta razón, aplicando el gradiente

de energías que se utiliza al emplear la técnica RER, se logra un aumento en la sensibilidad de los iones producto, que proporcionan un espectro de MS² muy intenso y rico en fragmentos, característico para cada compuesto y que permite elucidar las estructuras de una forma más clara [6].

El Quantum Access integra una base de datos de full MS/MS para más de 2000 compuestos que puede ser completada por el usuario incluyendo los espectros obtenidos, pudiendo utilizarla como elemento de confirmación en el caso de determinación positiva de los analitos estudiados en muestras contaminadas.

2.2.5. QED (Quantitative-Enhanced Data-Dependent Scan)

El dispositivo de análisis utilizado permite realizar adquisiciones en modo QED, en donde se llevan a cabo simultáneamente la adquisición en modo SRM y se realiza un barrido de fragmentos MS/MS durante un corto período de tiempo. La adquisición en modo SRM se utiliza para llevar a cabo la cuantificación e identificación del analito, apoyado por el espectro de MS² que sirve como complemento para la confirmación estructural del compuesto.

La adquisición en modo “Data-dependent” se realiza en base a los iones seleccionados para la SRM propia de un compuesto concreto, de modo que cuando un ión (m/z) seleccionado alcanza un umbral de intensidad prefijado por el usuario, el detector cambia el modo de adquisición a “full MS/MS” durante un corto período de tiempo (del orden de 150 ms), para volver otra vez a modo SRM. Se implementa una exclusión del m/z seleccionado durante el intervalo de tiempo correspondiente al ancho de pico, lo cual posibilita discernir compuestos coeluidos. [7]

3. BIBLIOGRAFÍA

[1] Quintela, O; Cruz, A; Concheiro, M; De Castro, A.; López-Rivadulla, M.; Metodología LC–MS. Aspectos generales de la técnica y sus aplicaciones en el campo de la toxicología; *Rev. Toxicol.*; 22, **2005**, pp. 7-14.

[2] Fenn, J.; Mann, M.; Meng, C.; Wong, S.; Whitehouse, C.; Electrospray ionization-principles and practice *Mass Spectrom. Reviews*; 9, **1990**, pp. 37-70.

[3] Ikonomou, M.; Blades, A.; Kebarle, P.; Electrospray-ion spray: a comparison of mechanisms and performance; *Anal. Chem.*; 63, **1991**, pp. 1989 - 1998

[4] Manisali, I; Chen, D.; Schneider, B; Electrospray ionization source geometry for mass spectrometry: past, present, and future; *TrAC*; 25, **2006**, pp. 243-256

[5] Ghosh, D.M; Churchill, M.; Genin, E.; Schoen, A.; Zero Cross-talk on the TSQ Quantum *Thermo Scientific Application Note 351* <www.thermo.com/appnotes> (Consulta: 27-04-2010).

[6] Maljers, L.; The impact of the Reversed Energy Ramp scan function on metabolite identification at or below the 1 μm level *Thermo Scientific Application Note 399* <www.thermo.com/appnotes> (Consulta: 27-04-2010).

[7] Beck, J.; Yamaguchi, M.; Saito, K.; Quantitation Enhanced Data-Dependent (QED) scanning of drinkingwater samples using EQuan for pesticide analysis on a triple stage quadrupole; *Thermo Scientific Application Note 378* <www.thermo.com/appnotes> (Consulta: 27-04-2010).

I.C. QUIMIOMETRÍA

1. DISEÑO EXPERIMENTAL	- 58 -
1.1. INTRODUCCIÓN	- 59 -
1.2. OPTIMIZACIÓN DE RESULTADOS	- 59 -
1.2.1. Diseño de experimentos Doehlert	- 61 -
2. BIBLIOGRAFÍA	- 63 -

La química analítica representa un área de conocimiento basada en estudios dependientes de multitud de factores. Las investigaciones en terreno medioambiental, alimentario, o agrícola implican trabajar sobre unas muestras que pueden responder de formas muy diversas dada su compleja naturaleza. Por otra parte, el tipo de analitos objeto de estudio en estos campos suelen ser moléculas orgánicas relativamente reactivas y susceptibles de sufrir procesos físicos o químicos ligados a los componentes de las matrices, normalmente bastante heterogéneas. Además, las condiciones de laboratorio así como los reactivos, disolventes, etc. utilizados durante el tratamiento de las muestras, afectan de distinta forma a los compuestos estudiados en cada caso.

Por ello, muchas veces el primer paso al desarrollar un método analítico, es evaluar los factores que pueden influir en el mismo, y analizar qué peso tiene cada uno en el comportamiento de los analitos y la muestra analizada. Para ello, es frecuente que la química analítica se apoye en la quimiometría como arma de análisis estadístico.

En esta Tesis se han utilizado diseños experimentales con el fin de optimizar los métodos desarrollados en la parte de salud alimentaria, es decir, la determinación de residuos de pesticidas en muestras de alimentos provenientes de explotaciones agrícolas.

1. DISEÑO EXPERIMENTAL

La **quimiometría** es la disciplina que estudia cómo interpretar los datos obtenidos y colocarlos en el contexto adecuado para extraer la mayor cantidad de información útil. Según la ICS (Internacional Chemometrics Society) la quimiometría es la *ciencia que permite relacionar las medidas realizadas en un sistema químico o proceso con el estado del mismo mediante la aplicación de métodos matemáticos o estadísticos*.

La quimiometría trata de forma específica de todos aquellos procesos que transforman señales analíticas y datos más o menos complejos en información. Se sitúa en un área de estudio interdisciplinar puesto que utiliza métodos de origen matemático, estadístico y del campo de la lógica, con fines ligados a la química. Algunas de sus aplicaciones incluyen relacionar conjuntos de datos, reconocer tendencias de los mismos o planificar cuándo y cómo realizar las experiencias para optimizar las respuestas. En este último caso es frecuente recurrir a la aplicación de un diseño experimental, estudiando la influencia de distintos factores sobre la respuesta observada [1].

1.1. INTRODUCCIÓN

El **diseño de experiencias** o experimentos es la parte de la quimiometría que estudia **dónde, cómo y cuándo** deben realizarse las experiencias para que contengan la información necesaria. Se trata de seleccionar la **estrategia experimental óptima** que permita obtener la información buscada con el mínimo coste y evaluar los resultados experimentales obtenidos, garantizando la máxima fiabilidad en las conclusiones que se obtengan. Para ello se realizan series de experimentos en donde se llevan a cabo cambios en las variables que afectan al proceso de interés. Estos experimentos se agrupan en diseños denominados **matrices de experimentos**. Éstas serán más complejas cuantas más variables se tengan en cuenta y cuantos más valores se fijen para cada una de ellas.

La evaluación de distintos tipos de diseños experimentales de técnicas de optimización de resultados o de superficies de respuesta, constituye algunos de los aspectos estudiados dentro del campo de la quimiometría [1-3].

1.2. OPTIMIZACIÓN DE RESULTADOS

Para la **optimización de los resultados** del proceso analítico se realiza un diseño experimental cuyo objetivo es conocer cuáles son los parámetros que tienen una mayor influencia sobre los resultados y obtener sus valores óptimos, con vistas a la desarrollar un procedimiento bajo las mejores condiciones posibles y aplicarlo a muestras reales.

Los **factores** son las variables que producen una influencia sobre el proceso y se van a cambiar a lo largo del desarrollo de los experimentos. Se distinguen los **intensivos** (cuyo valor no es función del tamaño del sistema) y **extensivos** (su valor es función del tamaño del sistema); continuos y discontinuos, etc. Por otra parte, se definen **factores principales** como aquellos que tienen relevancia estadística y constituyen la base de estudio del diseño [2].

Los **niveles de un factor** son los valores en los que difiere cada variable. En función del número de niveles, la matriz de experiencias será distinta, así como la estrategia a desarrollar y el tratamiento estadístico.

Se define por otra parte **efecto de un factor** como la variación en la respuesta producida por un cambio en el nivel del factor, entendiéndose por efectos principales los producidos por los factores principales.

Además de estudiar cómo varía la respuesta en función de cambios en los niveles de los factores, los diseños experimentales permiten estudiar la interacción de los mismos a distintos grados. La **interacción** entre factores se produce cuando el cambio en un nivel de un factor afecta a la respuesta producida por otro de los factores estudiados (es decir, cuando las respuestas de dos o más factores no son independientes).

La **resolución** asociada al diseño es el grado de confusión que va a haber entre los factores (de modo que sus efectos no se pueden separar y tratarse individualmente). La resolución de un diseño puede ser:

Diseño de resolución R= III: no confunde los efectos principales entre sí, pero sí los confunde con las interacciones de dos factores.

Diseño de resolución R=IV: no confunde los efectos principales con las interacciones de dos factores pero sí confunde las interacciones de dos factores entre sí.

Diseño de resolución R=V: no confunde los efectos principales con las interacciones de dos factores pero sí confunde las interacciones de dos factores con las de tres factores y éstas con las de más factores.

En función de los factores a estudiar, los niveles que se establezcan para cada uno y la resolución estadística que se desee obtener, se determina el uso de un diseño experimental concreto, que proporciona una **matriz de experimentos**. Los más utilizados son los **diseños de cribado de factores** (Screening Design) que determinan cuáles son los factores potencialmente influyentes. Dentro de estos diseños pueden encontrarse:

Diseño factorial completo: se incluyen medidas de respuesta para todas las combinaciones posibles de factores a todos los niveles. N factores y k niveles determinan $k \cdot N$ experimentos.

Diseño factorial fraccional: viene dado por $k \cdot N \cdot P$ experimentos. Este diseño normalmente se aplica a dos niveles ($k=2$). La mayor limitación es que los efectos principales se confunden con los términos de interacción.

Para optimizar las respuestas se suelen utilizar el modelo matemático de **superficies de respuesta**, en donde como resultado del tratamiento analítico, se obtiene una función matemática que determina el valor de la respuesta obtenida en función de los factores que se hayan considerado. Los experimentos más adecuados para calcular dichos modelos son el diseño central compuesto o el **diseño de Doehlert**.

A continuación se explica brevemente el funcionamiento del diseño Doehlert ya que se ha utilizado en varias ocasiones durante el desarrollo de esta Tesis.

1.2.1. Diseño de experimentos Doehlert

Los diseños experimentales Doehlert sirven para generar diseños para un máximo de 10 factores. En el caso más sencillo, el estudio de dos factores, la matriz de diseño viene definida por tres puntos que forman un triángulo equilátero que constituye un simplex regular que, al repetirse manteniendo uno de los puntos invariables (S_i) conforma un hexágono que será dominio experimental del diseño [4].

Como se ve en la imagen, el factor 1 presenta 5 niveles que definen los puntos en los vértices del hexágono y el punto central (+/-0,5; +/-1 y 0), mientras que el factor 2 varía en tres niveles (-/+0,866 y 0).

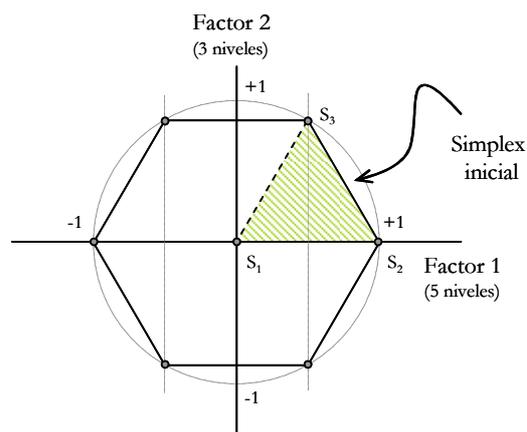


Figura I.C.1 Dominio experimental para un diseño Doehlert de dos factores.

Se define de esta forma una matriz de experiencias en función de los valores codificados, que sitúa los experimentos en los vértices de este hexágono y en el centro.

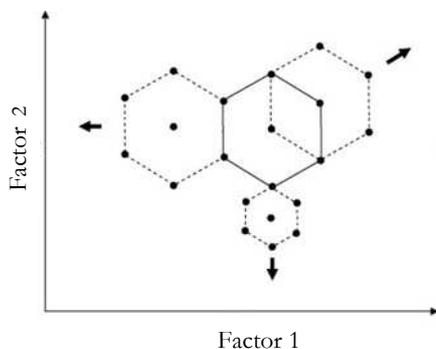


Figura I.C.2. Desplazamiento del dominio experimental.

Una de las ventajas que presenta este diseño es la posibilidad de desplazamiento dentro de la región experimental añadiendo puntos adyacentes a los ya obtenidos, lo cual resulta muy ventajoso cuando ha de modificarse el dominio del diseño.

Las aplicaciones de este tipo de diseños han crecido exponencialmente en el área de la química analítica debido a su sencillez y el reducido número de experimentaciones necesarias.

De hecho, el número de experiencias necesarias

puede calcularse de forma sencilla a partir de la siguiente ecuación:

$$N = k^2 + k + C_p$$

en donde N es el número de experiencias, k el número de factores, y C_p representa las réplicas realizadas para el punto central del diseño.

De esta forma, el estudio de **dos factores** implica la realización de **7 experiencias** (sin réplicas en el punto central) y 13 para el estudio de 3 factores, lo cual representa un número de experiencias muy pequeño en relación a la información que se puede desprender de las mismas tras el tratamiento estadístico de los resultados.

Además este tipo de diseños, a diferencia de los diseños experimentales de primer orden (diseños factoriales, por ejemplo), pueden usarse cuando las respuestas no se ajustan a un modelo lineal sino a uno cuadrático. Es por ello que aplicando este tipo de diseños para optimizar condiciones experimentales, puede estimarse el óptimo utilizando la **metodología de superficie de respuesta [5]**; esta consiste en un modelo matemáticos en donde en base a un grupo de datos experimentales se definen unas ecuaciones que ajustan los resultados observados en las experiencias definidas por el diseño, y predicen la respuesta en todo el dominio del mismo. A partir de esta ecuación y utilizando el criterio de Lagrange se pueden estimar las condiciones que producen una respuesta óptima.

Este criterio se basa en el determinante de una matriz hessiana que permite encontrar óptimos en superficies de respuesta con relativa facilidad. Tras el cálculo de las primeras derivadas parciales de la función que define la superficie de respuesta con respecto a cada una de las variables de dicha ecuación (que representan cada uno de los factores estudiados), se pueden calcular los valores óptimos de forma individual para cada factor (con el simple cálculo matemático del máximo de la curva).

2. BIBLIOGRAFÍA

[1] Ferré, J.; Rius, X.; Introducción al diseño estadístico de experimentos; *Técnicas de Laboratorio*, 274, **2002**, pp. 648-653.

[2] Box, G; Hunter, S.; Hunter, W.; Estadística para investigadores: Introducción al diseño de experimentos, análisis de datos y construcción de modelos; Editorial Reverté, **2005**.

[3] Box, G; Hunter, S.; Hunter, W.; Estadística para investigadores: diseño, innovación y descubrimiento; Editorial Reverté, **2005**.

[4] Fernandez-Ruano, L.; Tomás, X.; Aplicación de los diseños Doehlert en optimización secuencial; *Afinidad*; 459, **1995**, pp. 335-343.

[5] Almeida, M.; Erthal, R.; Padua, E.; Silveira, L.; Escalera, L.; Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry; *Talanta*; 76, **2008**, pp. 965-977.

I.D. TÉCNICAS DE PREPARACIÓN DE MUESTRA.

1. EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDOS (UAE)	- 68 -
1.1. FACTORES QUE AFECTAN AL PROCESO DE EXTRACCIÓN	- 68 -
2. EXTRACCIÓN ASISTIDA POR MICROONDAS (MAE)	- 69 -
2.1. FACTORES QUE AFECTAN AL PROCESO DE EXTRACCIÓN	- 69 -
3. EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPE)	- 71 -
3.1. PROCEDIMIENTO	- 72 -
3.2. DISPOSITIVOS	- 73 -
3.2.1. Empaquetados.....	- 74 -
3.2.2. Dispositivos on-line.....	- 74 -
3.3. FACTORES QUE AFECTAN AL PROCESO DE SPE	- 75 -
3.3.1. Tipo de muestra	- 75 -
3.3.2. Tipo de adsorbente.....	- 75 -
3.3.3. Proporción entre el adsorbente y la muestra	- 76 -
3.3.4. Condiciones de trabajo	- 77 -
3.4. VENTAJAS Y LIMITACIONES DE LA TÉCNICA	- 77 -
4. DISPERSIÓN DE MATRIZ EN FASE SÓLIDA (MSPD)	- 77 -
4.1. PROCEDIMIENTO	- 78 -
4.2. FACTORES QUE AFECTAN AL PROCESO DE MSPD	- 79 -
4.2.1. Tipo de muestra	- 80 -
4.2.2. Agente dispersante.....	- 80 -
4.2.3. Tamaño de partícula.....	- 81 -
4.2.4. Proporción muestra/dispersante.....	- 81 -
4.2.5. Disolventes utilizados en la extracción.....	- 81 -

4.2.6. Temperatura y presión.....	- 82 -
4.3. VENTAJAS Y LIMITACIONES DE LA TÉCNICA.....	- 82 -
5. DSPE (QuEChERS).....	- 83 -
5.1. INTRODUCCIÓN A LA TÉCNICA.....	- 83 -
5.2. PROCEDIMIENTO	- 84 -
5.3. FACTORES QUE AFECTAN AL PROCESO DE EXTRACCIÓN.....	- 86 -
5.3.1. Tipo de muestra.....	- 86 -
5.3.2. Homogeneización de la muestra.....	- 86 -
5.3.3. Disolventes utilizados en la extracción	- 87 -
5.3.4. Adición de sales y adsorbentes.....	- 87 -
5.3.5. pH.....	- 88 -
5.4. CONSIDERACIONES PRÁCTICAS.....	- 89 -
5.5. APLICACIONES DE MÉTODOS QuEChERS	- 89 -
6. BIBLIOGRAFÍA.	- 91 -

La investigación en el campo de la química analítica está cada vez más encaminada hacia el desarrollo de métodos basados en modelos multirresiduo que implican la monitorización de una amplia variedad de pesticidas, extraídos de una misma muestra, a partir de un análisis común. De un método multirresiduo se espera que sea rápido y fácil de reproducir, que requiera una cantidad mínima de disolventes (y reactivos en general), y asegure un cierto grado de selectividad, proporcionando resultados satisfactorios para una amplia gama de compuestos.

Desde hace años los métodos multirresiduo desarrollados para el análisis de muestras agrícolas en el ámbito de la salud alimentaria y contaminación medioambiental, implican el uso de disolventes orgánicos, tratándose en muchas ocasiones de una extracción con disolventes apolares [1, 2]. Este procedimiento suele funcionar bien para compuestos apolares o de polaridad baja pero no da buenos resultados cuando se utiliza en el análisis de pesticidas polares como por ejemplo insecticidas organofosforados.

Para poder efectuar el análisis multirresiduo de compuestos con un amplio rango de polaridades, se han ido introduciendo poco a poco cambios en la utilización de disolventes, combinados con el uso de distintas sales que favorecen el paso de los analitos a la fase orgánica, resultando en un aumento de las recuperaciones en el proceso de extracción.

Poco a poco se ha fomentado la aplicación de nuevas técnicas de extracción como extracción con fluidos supercríticos (SFE), extracción asistida por microondas (MAE), extracción asistida por ultrasonidos (UAE), extracción en fase sólida (SPE) dispersión de matriz en fase sólida (MSPD), extracción por fluidos presurizados (PFE), extracción acelerada con disolventes (ASE) o extracción en fase sólida dispersiva (DSPE). Estas técnicas no siempre se aplican en calidad de métodos de extracción sino que a veces juegan un papel esencial dentro de una etapa de limpieza de un extracto obtenido previamente mediante una extracción sólido-líquido (SLE) o líquido-líquido (LLE).

Durante el desarrollo de esta Tesis se han manejado gran cantidad de muestras de composición muy distinta con el mismo objetivo: determinar residuos de plaguicidas ampliamente utilizados hoy en día en el ámbito agrícola, y restos de pesticidas obsoletos que resultan persistentes. Debido al gran número de sustancias objeto de estudio, se hace necesario aplicar una metodología que permita obtener buenos resultados para los distintos pesticidas evaluados, desarrollando determinaciones analíticas rápidas y eficientes, que impliquen un bajo consumo de tiempo y de material, y que resulten fácilmente reproducibles.

Para ello, se ha contado con cinco técnicas de preparación de muestra, en muchos casos, combinando una de ellas para extraer los analitos y otra para limpiar los extractos orgánicos eliminando las posibles interferencias debidas a la matriz. En la siguiente tabla se

resumen las técnicas utilizadas para cada matriz y la finalidad de la aplicación de la metodología seleccionada en cada caso.

Tabla I.D.1. Metodologías de extracción y limpieza de extractos utilizadas

	Técnica de extracción	Técnica de limpieza de extractos
Muestras de leche	SPE y LLE*	DSPE*
Muestras de miel y polen	LLE, SPE, MSPD, UAE	SPE
Muestras de agua	SPE	
Muestras de tierra	MAE	SPE

* Englobado en la metodología QuEChERS que se explica a continuación

La gran mayoría de ellas son técnicas conocidas y ampliamente estudiadas, y no creo que sea objetivo en esta Memoria el abarcar un estudio teórico acerca de los fundamentos de las mismas, por lo que se hará a continuación una breve introducción centrada en los aspectos prácticos más importantes.

Sin embargo, la DSPE es una técnica utilizada recientemente como parte de una metodología analítica conocida bajo el nombre de QuEChERS, desarrollada en los últimos 7 años y que ha empezado a despuntar hace unos 5, convirtiéndose en una alternativa a las técnicas aplicadas anteriormente. Por ello creo conveniente presentarla un poco más en profundidad.

1. EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDOS (UAE)

Se trata de una técnica de extracción sólido-líquido que utiliza sonidos de alta frecuencia con el fin de desprender el compuesto buscado de la matriz en que está retenido. Las partículas sólidas y líquidas vibran y se aceleran ante la acción ultrasónica. Como resultado el soluto pasa rápidamente de la fase sólida al disolvente. El ultrasonido además facilita la rehidratación (si se están analizando matrices secas) lo cual incrementa el transporte de los constituyentes solubles hacia el disolvente por difusión y procesos osmóticos [3].

1.1. FACTORES QUE AFECTAN AL PROCESO DE EXTRACCIÓN

Las variables que afectan a la eficiencia de la extracción son el tipo y cantidad de matriz, el disolvente utilizado para realizar la extracción, así como el volumen del mismo, el

tiempo de extracción y la concentración de sales en el medio, ya que estas afectan a la solubilidad de analitos y favorecen el paso de éstos a la fase orgánica [4, 5]. Se ha comprobado también que a temperatura alta se consigue un mejor aprovechamiento de la energía de ultrasonidos, de forma que el contacto con la matriz sólida se produce en mayor medida por lo que el paso de los compuestos hacia la fase orgánica se ve favorecido [6]. Una de las ventajas que presenta, además de la sencillez y rapidez del proceso de extracción es que permite trabajar a temperatura ambiente por lo que compuestos termolábiles no se ven afectados en el proceso de extracción, al contrario de lo que ocurre al aplicar otras técnicas.

2. EXTRACCIÓN ASISTIDA POR MICROONDAS (MAE)

Las microondas son ondas electromagnéticas con campos eléctricos oscilantes que producen cambios en la orientación de los dipolos (permanentes o inducidos) de las moléculas. De esta forma, las cargas moleculares se alinean en la misma dirección del campo eléctrico que, al oscilar, origina un movimiento de rotación de los dipolos, lo que se traduce en una vibración de las moléculas que trae consigo la liberación de energía térmica. La transferencia de energía no se produce por convección o conducción como en los métodos convencionales, sino por pérdidas dieléctricas (que dependen de la constante dieléctrica del disolvente)[7].

Con frecuencias del orden de 2450 MHz, $\lambda = 12,2$ cm (la utilizada en los sistemas comerciales), un ciclo de rotación dipolar ocurre unas $5 \cdot 10^9$ veces por segundo, lo que resulta en un rápido calentamiento del contenido del recipiente introducido en el extractor de microondas [8].

Este proceso es muy diferente de la extracción de disolvente clásica, en donde la eficacia de la extracción depende mucho de la afinidad del disolvente por los analitos y las interferencias de la matriz, así como del buen contacto entre el analito y el disolvente para provocar la migración desde la matriz hacia el extractante.

2.1. FACTORES QUE AFECTAN AL PROCESO DE EXTRACCIÓN

Hay varios parámetros que pueden afectar a la eficacia de la extracción de microondas. Entre ellos los más importantes son la naturaleza del disolvente y de la matriz, la temperatura del sistema y el tiempo de extracción [8]:

- **Naturaleza del disolvente, de la matriz y los analitos** - Dado que la absorción de microondas ocurre por la reorientación de dipolos en un campo eléctrico, la cantidad de energía absorbida será dependiente de las propiedades dieléctricas de las moléculas presentes en el proceso: constante dieléctrica del disolvente utilizado como extractante (ϵ'), factor de pérdida dieléctrica (ϵ'') y factor de disipación ($\tan \delta = \epsilon''/\epsilon'$). Valores grandes de este parámetro indican una buena susceptibilidad a la energía de microondas. Como guía general, cuanto mayor sea la constante dieléctrica, más energía térmica será liberada y más rápidamente se alcanzarán temperaturas a las cuales el paso de los analitos de la matriz al disolvente se ve favorecido. Por lo tanto para que la extracción sea efectiva, es necesario que el disolvente sea polarizable. En consecuencia, el efecto de la energía de microondas depende en gran medida de la naturaleza del disolvente y de la matriz. La mayoría de las veces, el disolvente elegido tiene una elevada constante dieléctrica, por lo que absorbe fuertemente la energía de microondas. Sin embargo, en algunos casos sólo la matriz puede ser calentada, de manera que los analitos son liberados en un disolvente frío (esto es particularmente útil para evitar la degradación de ciertos compuestos termolábiles) [8]. Este aspecto representa la mayor limitación de esta técnica puesto que no se puede aplicar de forma satisfactoria con disolventes apolares, que absorben pobremente la radiación de microondas. [9, 10, 7]

- **Temperatura** – Valores elevados de temperatura generalmente aumentan la eficacia de la extracción como resultado del aumento de la difusión del disolvente en las partes internas de la matriz, además de propiciar la desorción de los analitos que están absorbidos o adsorbidos en sitios activos de la matriz. Pero este parámetro ha de ser controlado puesto que no conviene llegar a temperaturas en las que los compuestos sean degradados. Por lo tanto ha de establecerse una temperatura de compromiso en la que los analitos difundan de forma adecuada hacia el disolvente y no se produzcan pérdidas por degradación. La presión está directamente relacionada con la temperatura en extractores de microondas con vasos de extracción cerrados.

- **Potencia de microondas** – La potencia de microondas aplicada al sistema determinará la temperatura del mismo. Los extractores de laboratorio tienen generalmente la posibilidad de realizar varios análisis al mismo tiempo (son muy comunes los dispositivos de 12 posiciones), por lo que la potencia aplicada dependerá del número de análisis simultáneos que se realicen.

- **Tiempo de extracción** – El tiempo de extracción también influye puesto que es el tiempo en que la muestra está sometida a la radiación de microondas. De todas formas, el aumento en la eficacia de la extracción no es lineal con el tiempo, y puede que si se exceden mucho los períodos de exposición de las muestras y analitos a esta radiación, el resultado final sea la degradación de compuestos termolábiles.

- **Humedad de las muestras** – Dado que el agua es un disolvente que absorbe fuertemente las radiaciones de microondas, el contenido de humedad de las muestras determinará la radiación de microondas que es absorbida por el resto de componentes, pudiéndose producir una disminución de la efectividad del proceso de extracción puesto que parte de la radiación es absorbida por el agua y no se produce la excitación molecular esperada. Esto afecta sobre todo a la hora de obtener resultados reproducibles. En ciertas ocasiones, el contenido de agua tiene un efecto positivo sobre la eficacia de la extracción, sobre todo cuando se usan disolventes con una constante dieléctrica baja

3. EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPE)

La SPE es una técnica de preparación de muestra aplicada a partir de los años 70, que se puede utilizar para extraer compuestos de una matriz, o para limpiar extractos orgánicos eliminando las interferencias que hayan sido coextraídas previamente. Como técnica de extracción, es un proceso mediante el cual cantidades traza de un analito son selectivamente retenidas, separadas y concentradas a partir de volúmenes relativamente grandes de muestras líquidas, gaseosas o extractos de muestras sólidas.

Una fase que contiene los compuestos de interés se hace pasar a través de un adsorbente empaquetado en una columna, un cartucho o un disco de SPE de forma que, o bien los analitos o bien las interferencias presentes en la muestra quedan retenidos en el material adsorbente. En el primero de los casos, los compuestos son arrastrados posteriormente por un disolvente que interaccione más fuertemente con ellos que el material empaquetado en el dispositivo de SPE, de forma que la interacción entre el adsorbente y el analito se rompe y éste se eluye junto con el disolvente. [11, 12].

En realidad funciona como una columna cromatográfica y los principios de separación son los mismos, logrando una retención selectiva atendiendo a criterios de **polaridad**, de **carga** o de **tamaño de partículas**. Lo más habitual al analizar residuos de pesticidas es realizar la separación de componentes en función de la polaridad, de forma que cuando lo que se espera es retener los compuestos, se usan cartuchos cuyo empaquetado tenga polaridad similar a los analitos de interés.

3.1. PROCEDIMIENTO

Durante la extracción de los analitos se establece una distribución de los mismos entre la fase estacionaria y la fase que contiene los analitos de interés, al igual que ocurre en una columna cromatográfica.

El procedimiento de extracción consta de 3 etapas básicas

1 – Acondicionamiento del cartucho

Los cartuchos de SPE han de acondicionarse previamente a la extracción. Este paso suele llevarse a cabo con metanol y con el disolvente que se usará en la elución de los analitos o con el que se va a pasar por el cartucho. El metanol se utiliza para eliminar la humedad que pueda haber en el empaquetado y que disminuiría su eficiencia. Por otra parte, se hace un lavado previo con el disolvente de elución para que arrastre partículas que puede haber en el cartucho, de forma que estas se eliminarán y no supondrán una interferencia [11].

2 – Carga de la muestra

La muestra se pasa a través del dispositivo de SPE y se produce una distribución de los compuestos entre el disolvente y la fase estacionaria contenida en la columna de SPE (o cartucho o disco, según el caso). Al final de este proceso se lleva a cabo una etapa de lavado de la columna con un disolvente que no arrastre los compuestos para eliminar los restos de posibles interferencias.

3 – Elución de los analitos

Por último los analitos son eluidos con un disolvente de mayor polaridad que la fase estacionaria, de forma que las interacciones entre ésta y los compuestos se rompen y el reparto de los analitos se desplaza hacia la fase orgánica, arrastrándolos y obteniendo un extracto con los compuestos.

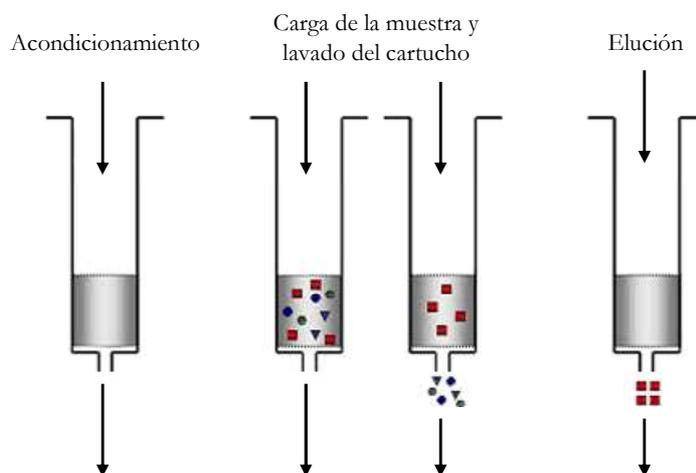


Figura I.D.1. Esquema del procedimiento de SPE como método de extracción

De esta manera se llevan a cabo **extracciones** o **limpiezas de extractos**. En el primer caso, los analitos retenidos en la columna han de ser eluidos con un disolvente adecuado, produciéndose al mismo tiempo una etapa de concentración de los compuestos con respecto a la muestra inicial con un riesgo mínimo de pérdida o contaminación. En el segundo caso lo que se pretende es eliminar las interferencias presentes en la fase líquida por lo que el disolvente que atraviesa la columna se recoge a la salida de la misma, puesto que la fase estacionaria del cartucho de SPE no debe retener a los compuestos.

3.2. DISPOSITIVOS

Actualmente se pueden encontrar 3 dispositivos básicos de SPE en el mercado: discos, cartuchos y jeringas. La elección de uno u otro dependerá de la aplicación de la técnica de SPE dentro del procedimiento de preparación de muestra: como método de extracción o de limpieza de extractos, del volumen de muestra a tratar, y de la naturaleza química de los compuestos que se desea separar o eliminar.

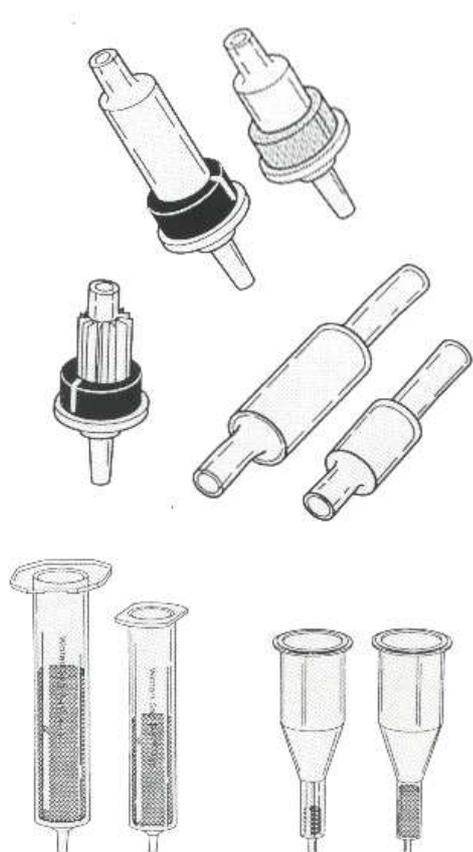


Figura I.D.2. Algunos dispositivos de SPE comercializados actualmente

estacionaria se realiza mediante enlaces de hidrógeno e interacciones de tipo dipolo-dipolo. Si el empaquetado es apolar (normalmente con cadenas hidrocarbonadas C_{18} , C_8 o C_2), la interacción se produce por enlaces entre los carbonos e hidrógenos de las moléculas y la fase estacionaria. [12].

En la figura I.D.2 se muestran los dispositivos de empaquetado existentes. Suele acoplarse un sistema de vacío a los cartuchos y jeringas y con el que se pueden fijar los flujos de paso de fase en las distintas etapas; además permite realizar un mayor número de extracciones al mismo tiempo y obtener menos variabilidad en las mismas puesto que se realizan de una forma más constante en cuanto a la presión aplicada al cartucho a la hora de forzar el paso de la muestra por el mismo.

3.2.1. Empaquetados

Los empaquetados que presentan los dispositivos de SPE son de distinta naturaleza atendiendo al proceso de extracción en fase sólida que se requiera. En el caso práctico de aplicación de la SPE a la extracción de pesticidas, se utilizan dispositivos de retención selectiva en función de **polaridades**. La SPE en **fase reversa** supone una fase estacionaria apolar que retiene analitos apolares o de polaridad baja, mientras que la SPE en **fase normal**, contiene material polar en su empaquetado de forma que los analitos retenidos son de polaridad moderada – alta. En el primer caso, la interacción entre los analitos y la fase

3.2.2. Dispositivos on-line

Una de las grandes ventajas que supone la utilización de la SPE como técnica de extracción es la posibilidad de realizar extracciones en línea con el cromatógrafo de líquidos y

de gases, siendo mucho más común el primero de los casos. De esta forma se simplifica el tratamiento de la muestra para la extracción, limpieza, concentración, separación y detección de los analitos, con un tratamiento integrado y automatizado que, por lo general, requiere de menor volumen de muestra. Además se minimiza el riesgo de contaminación de la muestra, y de pérdidas por volatilización. El parámetro más influyente al utilizar este tipo de técnica es el disolvente de elución así como su volumen y PH [13, 14].

Se trata de una técnica muy utilizada en determinación de residuos de compuestos como pesticidas, fármacos y otras sustancias en aguas [13- 17]

3.3. FACTORES QUE AFECTAN AL PROCESO DE SPE

Como en la gran mayoría de las técnicas actuales de tratamiento de muestra, los factores que determinan el procedimiento experimental son la matriz, el empaquetado, los disolventes y los analitos.

3.3.1. Tipo de muestra

Si se trata de muestras sólidas en este caso han de ser extraídas previamente con un disolvente o diluidas en un solvente adecuado para que la muestra percole por el cartucho. Sería pues, en este caso, más una etapa de limpieza de los extractos en donde o bien se retienen los compuestos sobre el material de SPE (por lo que la muestra cargada en la columna no se aprovecha), o bien se retienen las interferencias (por lo que la muestra que se carga se recoge al final).

En cuanto a muestras líquidas, es común el tratamiento de largos volúmenes de muestras si no son líquidos muy complejos (muestras de agua de ríos, por ejemplo) puesto que con muestras más heterogéneas (leche) o más viscosas (miel) se hace necesario diluir para rebajar el efecto de presión en el sistema.

3.3.2. Tipo de adsorbente

La selección de un material de SPE adecuado es muy importante a la hora de elaborar un método analítico. Las características físicas como área superficial, tamaño de poro, volumen

de poro o tamaño de partícula determinan el comportamiento del material como adsorbente; a grandes rasgos pueden clasificarse en tres clases: Los empaquetados **con base de sílica**, los **poliméricos** y el **carbón activado o GCB** (del inglés *Graphitized Carbon Black*). Todos ellos pueden modificarse de distintas formas para cambiar sus propiedades como extractante.

Los materiales más comunes son cartuchos de **sílica**, **alúmina** o **florisil** cuando se habla de SPE en **fase normal** (es decir para retener compuestos polares) y C_8 y C_{18} cuando se habla de **fase reversa** (para compuestos **apolares** o **poco polares**).

En los últimos años se ha aplicado mucho el empaquetado a base de carbón graficitado, de carácter hidrofóbico y con una superficie muy homogénea, muy recomendado para retener compuestos pequeños, polares y de carácter ácido retenidos en agua y aire, En este caso, la elución se ve favorecida cuando el pH del eluyente es inferior al pKa del analito [18].

Han surgido también empaquetados poliméricos a base de resinas químicamente modificadas o copolímeros macroporosos. Es el caso del HLB (del inglés *hydrophilic lipophilic balanced*), MCX, WCX, MAX o WAX entre otros, que presentan en su estructura distintos centros químicos capaces de retener compuestos de distinta polaridad o carga iónica, según el caso. De esta forma se pueden desarrollar métodos de SPE robustos, que minimizan los problemas de reproducibilidad y recuperaciones bajas debidas a la actividad no deseada de los silanoles, el secado de los sorbentes, las limitaciones de pH, y la degradación de los metabolitos y los compuestos polares. Estos materiales proporcionan extractos más limpios, con poco efecto matriz reduciendo la supresión iónica [18].

Durante el desarrollo de esta tesis se han utilizado columnas de SPE y cartuchos con empaquetados clásicos (C_{18} , sílica, alúmina neutra y florisil) así como columnas de carbón graficitado (Carboprep) y de empaquetado copolimérico (Oasis HLB, que utiliza como adsorbente un copolímero formado por dos monómeros divinilbenzeno y N-vinilpirrolidona

3.3.3. Proporción entre el adsorbente y la muestra

Las cantidades normales que se utilizan van desde 1 a 10 gramos o más, en función del volumen de muestra. En matrices algo concentradas, o cuando se carga en el cartucho volúmenes grandes de muestra, llega un momento en el que se interrumpe la retención – **breakthrough** – debido a que el dispositivo de SPE ha llegado a su capacidad máxima de adsorción.

3.3.4. Condiciones de trabajo

Si bien la temperatura y la presión no tienen gran influencia en el proceso de retención en sí, el **pH** de la muestra y del **eluyente** sí que presentan un efecto a considerar. A valores de pH inferiores al pKa del analito, éste se encontrará en forma iónica viéndose alterada su retención sobre el empaquetado de la columna.

3.4. VENTAJAS Y LIMITACIONES DE LA TÉCNICA

Se trata de una técnica rápida, fácil, automatizable y que resulta reproducible. Además asegura un cierto grado de selectividad y no resulta excesivamente cara. Tiene múltiples aplicaciones obteniéndose resultados satisfactorios con muestras ambientales, agrícolas, alimentarias, biológicas... A nivel experimental, la ausencia de emulsiones en comparación con la LLE clásica, y la obtención de extractos limpios y concentrados en un solo paso hace que sea muy recomendable su aplicación.

Por otra parte, uno de los mayores inconvenientes es el volumen de *breakthrough*, que una vez superado supone la ausencia de retención puesto que todos los sitios susceptibles de interactuar con los analitos están ocupados. Además en ciertas ocasiones, para métodos multiresiduo, las condiciones experimentales no son válidas para aislar ciertos analitos, que se pierden puesto que quedan retenidos en la columna y las recuperaciones calculadas son muy bajas en estos casos.

4. DISPERSIÓN DE MATRIZ EN FASE SÓLIDA (MSPD)

La MSPD se presenta con la novedad respecto a las clásicas utilizadas hasta ese momento, de que el **aislamiento de compuestos** se logra mediante la **disrupción de matrices sólidas** en un proceso en donde **la matriz y el dispersante se mezclan con ayuda de un mortero y un pistillo** (u otro dispositivo mecánico) hasta lograr una dispersión homogénea de la matriz, resultando un procedimiento experimental muy sencillo en comparación con las técnicas clásicas.

Este procedimiento resulta efectivo debido a que las fuerzas cortantes derivadas de la fricción aplicada al mezclar la muestra y el agente dispersante provocan la ruptura del material en fragmentos de menor tamaño que se disuelven en una fase orgánica, generalmente enlazada

sobre un soporte sólido, con la consecuente **disrupción** de la muestra y su **dispersión** sobre dicha superficie. [19]. Se ha comprobado que, efectivamente, el proceso de la mezcla entre la muestra y el dispersante con un mortero, facilita la disrupción mecánica de la estructura de la matriz [20].

Inicialmente esta técnica se orientó al estudio de fármacos en matrices biológicas partiendo de la investigación llevada a cabo por *Barker et al.* [21], en donde se determinan fármacos de tipo organofosforados, benzimidazoles y antibióticos de tipo β -lactanos, aunque su aplicación pronto se vio ampliada al campo de pesticidas y otros contaminantes químicos en distintas matrices medioambientales, biológicas o alimentarias.

4.1. PROCEDIMIENTO

Tal y como se ilustra en la figura I.D.3, el procedimiento implica 3 etapas básicas:

- Una **muestra** (líquida, semisólida o sólida) se añade a un mortero y con ayuda de un pistillo se **mezcla** con un **agente dispersante** para conseguir la dispersión y disrupción de la primera sobre el segundo.

- La mezcla se transfiere a una columna que generalmente se encuentra vacía a no ser por la presencia de una frita en el fondo de la misma. Generalmente una vez añadida la mezcla de muestra y dispersante se coloca otra frita en la parte posterior para proceder a empaquetar el contenido de una forma compacta, aunque no demasiado para no sobrepresionar el sistema a la hora de la elución y evitando la formación de surcos.

- Los analitos que se encuentran en el dispersante, son eluidos siguiendo el mismo principio que la SPE. En este caso, como se ha visto también en el apartado I.D.3, hay que tener en cuenta si el dispersante retiene los compuestos o las interferencias. En el primero de los casos, se realiza un lavado previo de la columna que arrastre los componentes que no resultan de interés, mientras que en el segundo caso la elución se lleva a cabo directamente con un disolvente que tenga alta afinidad por los analitos.

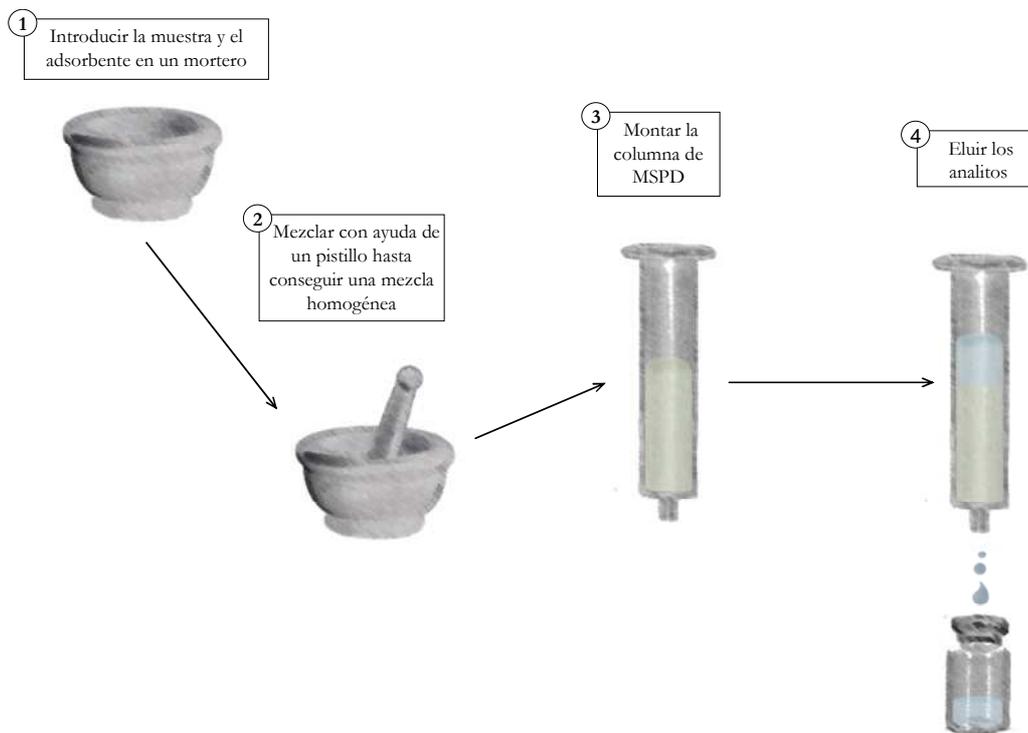


Figura I.D.3. Procedimiento general de una extracción por MSPD.

Se suele trabajar con tamaños pequeños de muestra (alrededor de **0.5 g**). En algunos procedimientos se han utilizado abrasivos que también poseen propiedades de agente de secado, como sílica o sulfato sódico anhidro, conduciendo a la formación de un material finamente dividido pero también lo suficientemente seco para la posterior extracción. En cuanto al empaquetado, en ciertas ocasiones la mezcla se introduce en una columna que contiene en el fondo un absorbente de SPE para lograr eliminar ciertas interferencias de una forma más eficiente.

4.2. FACTORES QUE AFECTAN AL PROCESO DE MSPD

La matriz analizada ha de interactuar con el dispersante seleccionado para que se pueda producir la disrupción de la misma y la transferencia de los compuestos de uno a otro

soporte. La distribución de los analitos en el material depende de las interacciones con las fases enlazadas y soportes sólidos, así como de los componentes de la matriz y los disolventes de elución, así como el tamaño de partícula.

4.2.1. Tipo de muestra

Esta técnica se ha aplicado a muestras sólidas, semisólidas, líquidas y viscosas. En cuanto al análisis con MSPD, la diferencia que existe entre ellas radica en la interacción que presentan con los analitos y el efecto matriz asociado a las determinaciones. En general, las muestras sólidas son más complejas y presentan interacciones con los analitos más fuertes que las líquidas, de composición más homogénea.

Algunas veces hay que incluir modificadores a la muestra para lograr el estado requerido para que la extracción sea efectiva. Para ello se echa mano de ácidos, bases y agentes quelantes (EDTA), o sales (NaSO_4 para eliminar el exceso de agua), entre otros, durante la etapa de mezclado de la muestra o como aditivo en el disolvente de elución [19]. Con ello se logra potenciar la disrupción de la muestra, la adsorción de los analitos sobre el agente dispersante y en ciertas ocasiones conduce a la modificación del perfil de elución [20].

4.2.2. Agente dispersante.

La hipótesis original que plantearon *Barker et al.*, fue la posibilidad de provocar la disrupción de las membranas de tejidos biológicos a través de la solubilización de los fosfolípidos y el colesterol en un material lipofílico (C18 y en algunos casos C8) enlazado a una fase sólida de sílica (SiO_2), que jugaría el papel de los surfactantes y detergentes empleados en metodología más clásicas [20].

La muestra presenta distintas interacciones de carácter hidrofóbico e hidrofílico con el agente dispersante, lo que genera una fase con unas características que permiten aislar ciertos componentes de la muestra (o bien los analitos, o bien las interferencias).

Con el estudio y la aplicación de esta técnica se definieron otros materiales de dispersión de diversa naturaleza que no poseen, aparentemente, las mismas propiedades dispersivas que el C_{18} . En los últimos años se han utilizado materiales como **silicatos sin derivatizar** (**sílica gel**, etc.) u otros **sólidos orgánicos** (fibras grafitizadas) o **inorgánicos** (**Florisil o alúmina**) que también provocan la disrupción de la muestra y que presentan una

selectividad con respecto a los analitos distinta que el material utilizado originalmente [20]. Asimismo, es frecuente la utilización de **materiales no retentivos** como arena, químicamente inerte, que actúa produciendo simplemente la disrupción. Por otra parte en los últimos años ha cobrado importancia la utilización de **materiales poliméricos** de alta selectividad como MIPs (del inglés *Molecular Imprinted Polymers*) o nanomateriales como MWCNTs (del inglés *multi wall carbon nanotubes*) que presenta una gran área superficial, lo cual permite aumentar la adsorción de los compuestos.

Es tan importante el efecto del agente dispersante, que la clasificación de las distintas variantes de la MSPD puede hacerse en base a la naturaleza del material utilizado en cada caso.

Al igual que ocurre con la SPE, se habla de **fase reversa** cuando se utilizan materiales dispersante de carácter lipofílico, como C_8 o C_{18} y MSPD en **fase normal** cuando se usan materiales de carácter polar como florisil o alúmina, silicatos sin derivatizar o fases enlazadas a sílica.

4.2.3. Tamaño de partícula

El tamaño de partícula del agente dispersante condiciona los flujos de disolvente que atraviesan la columna empaquetada. Lo más común es trabajar con material que presente un tamaño de partícula de entre 40-100 μm de diámetro. Tamaños menores conducen a flujos muy bajos, incluso a veces inexistentes.

4.2.4. Proporción muestra/dispersante

Normalmente se utiliza una relación de 1:1 a 1:4 dependiendo de la muestra a tratar y del poder de disrupción y retención del material utilizado como agente dispersante. Las cantidades utilizadas deben garantizar la formación de una base homogénea y bien distribuida. Normalmente esta proporción es un factor que se optimiza en cada uno de los casos de forma experimental.

4.2.5. Disolventes utilizados en la extracción

Los disolventes utilizados están estrechamente relacionados con el material dispersante y con los analitos. El disolvente aplicado para eluir los analitos, al igual que para la SPE tiene polaridad similar a éstos; sin embargo, si lo que se pretende es arrastrar las interferencias, se utiliza un disolvente con polaridad muy alejada de la que presentan los compuestos de interés.

Normalmente se utilizan mezclas de disolventes orgánicos pero en algunas aplicaciones la utilización de agua a alta temperatura produce resultados satisfactorios [20].

También se debe tener en cuenta la retención y elución de los componentes de la matriz de la muestra. Es decir, el material dispersante debe retener a la muestra lo más posible en la columna, y el disolvente debe eluir a los analitos con un elevado grado de especificidad. El volumen de elución varía en función de la aplicación y es un parámetro que se debe examinar para reducir en lo posible el uso de disolvente orgánico y la coelución de interferencias [22].

4.2.6. Temperatura y presión

La MSPD puede combinarse con otras técnicas para lograr extracciones más efectivas. Es el caso de la aplicación de extracción asistida con ultrasonidos o extracción con agentes presurizados (PSE) en paralelo a la MSPD.

4.3. VENTAJAS Y LIMITACIONES DE LA TÉCNICA

La MSPD resulta una técnica ampliamente utilizada debido a su **sencillez a nivel experimental** y a los **buenos resultados obtenidos en multitud de aplicaciones** para la determinación de **distintos grupos de moléculas**. La **versatilidad** y la **flexibilidad** de esta técnica hacen que sea recomendable para multitud de matrices tanto ambientales como biológicas, agrícolas o alimentarias, definiendo un amplio abanico de aplicación.

Una de las mayores ventajas que presenta radica en las pequeñas cantidades de reactivos y de muestra que se requieren para realizar la extracción, así como la ausencia de dispositivos específicos y la posibilidad de trabajar en condiciones normales de temperatura y presión.

El procedimiento analítico se **acorta** y **simplifica** con respecto a los procedimientos clásicos, eliminando también la formación de **emulsiones**, y dado que toda la muestra se expone por igual al extractante, **se mejora la eficacia de la extracción** de los analitos. Por último, posibilita la realización de las etapas de **extracción y limpieza** de los extractos en un solo paso, al igual que ocurre con la SPE.

Por otro lado, como toda técnica analítica, presenta una serie de inconvenientes y limitaciones. Aplicada en modo multirresiduo, en ciertos casos, alguno de los analitos objeto de estudio no es eluído correctamente, obteniendo recuperaciones bajas.

La etapa de homogeneización suele ser más lenta que en otras técnicas puesto que ha de mezclarse la muestra en el mortero para promover la actuación como “abrasivo” del agente dispersante cuando se mezcla con la muestra. Por lo tanto, tiene gran influencia la forma de trabajar del operario. Además para muestras viscosas, gran cantidad de restos quedan en el material y muchas veces son difíciles de arrastrar por lo que las extracciones en estas ocasiones carecen de una alta repetibilidad y reproducibilidad [20].

5. DSPE (QuEChERS)

A pesar de que las técnicas de preparación de muestra aplicadas en los últimos años, requieren el uso de menos disolventes orgánicos que las técnicas de extracción más clásicas, presentan una serie de inconvenientes como por ejemplo, en ciertos casos, los complejos dispositivos que han de utilizarse, la baja selectividad de alguno de los métodos aplicados o el efecto negativo del agua sobre la respuesta en matrices con alto porcentaje de humedad, además del consumo de tiempo y material.

La necesidad de un método simple, rápido, seguro y válido para llevar a cabo un análisis multirresiduo que proporcione unos resultados satisfactorios, llevó a Anastassiades et al. [23] a desarrollar una metodología analítica que se dio a conocer bajo el nombre de **QuEChERS**, que atiende a las siglas de las palabras **Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, y Safe**.

5.1. INTRODUCCIÓN A LA TÉCNICA

El método QuEChERS consiste en una extracción basada en el reparto de los analitos entre una fase acuosa y un disolvente, seguido de un paso de purificación de la fase orgánica mediante un proceso de dispersión en fase sólida.

La etapa de extracción se lleva a cabo con disolventes orgánicos, generalmente **acetonitrilo, acetato de etilo o acetona**, que se tratan posteriormente con **sulfato de**

magnesio o **sulfato de sodio** para eliminar el agua presente debido a la humedad de la muestra y propiciar el reparto de los analitos hacia la fase orgánica [24].

En la etapa de purificación se lleva a cabo una SPE dispersiva del extracto orgánico en presencia de una **PSA** (amina primaria/secundaria) para eliminar pigmentos polares, ácidos orgánicos y otros productos presentes en la matriz que pudieran interferir con los analitos.

Generalmente la PSA se usa combinada con **C₁₈** o con **CGB** (Carbón grafítico comercializado bajo el nombre de Supelclean Envi-Carb) para eliminar lípidos, esteroides y pigmentos. En casos concretos, se añade también alguna sal tipo cloruro sódico o acetato de sodio si se llevan a cabo extracciones de compuestos sensibles a pH alcalino.

5.2. PROCEDIMIENTO

Desde su primera aplicación en el año 2003 por *Anastassiades et al.* [23] el método QuEChERS ha ido sufriendo modificaciones en cuanto a los reactivos utilizados y las proporciones de los mismos, dependiendo de los analitos y las matrices a estudiar [25]. Se describe a continuación el procedimiento original [23] para extraer pesticidas en muestras de frutas y vegetales:

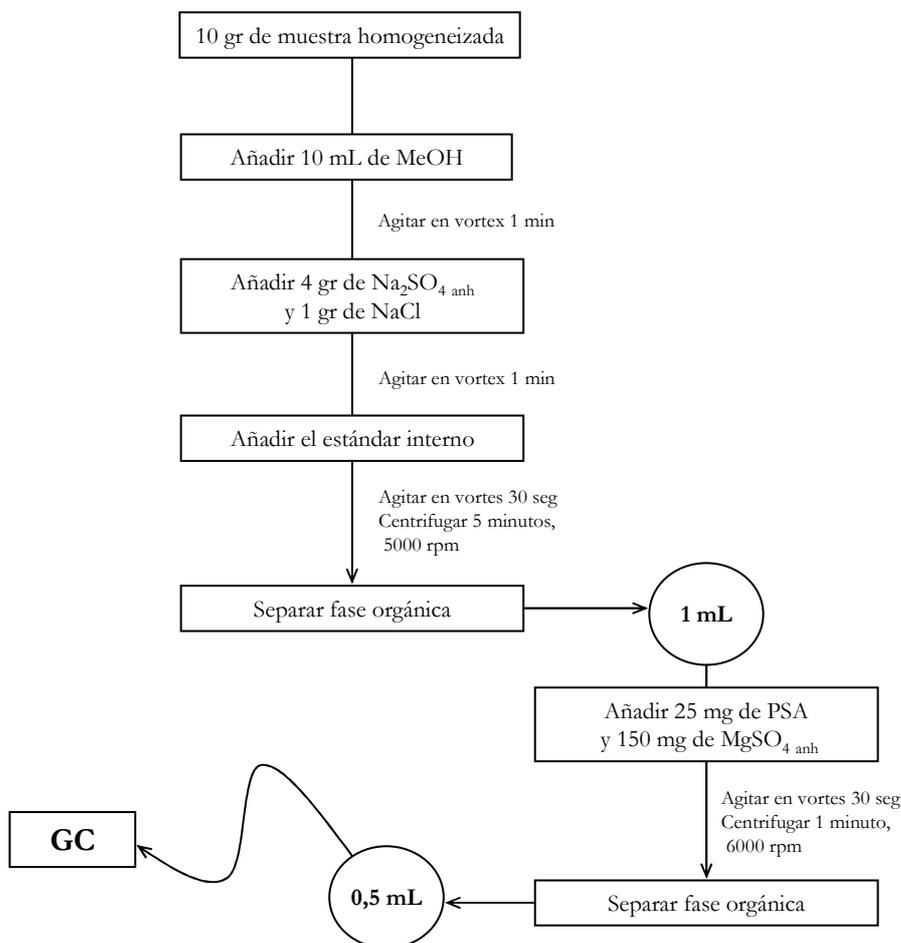


Figura I.D.4. Procedimiento desarrollado por *Anastassiades et al.*

De forma general, puede decirse que el método QuEChERS implica la preparación de la muestra en 3 pasos: homogeneización de la muestra, reparto de los compuestos entre una fase orgánica y una acuosa en presencia de sales y por último una etapa de limpieza de los extractos usando DSPE.

Como sus siglas indican, se trata de una metodología analítica rápida, efectiva y fácil de reproducir, que por su bajo consumo en productos químicos resulta más segura que las utilizadas anteriormente con los mismos objetivos y que proporciona respuestas satisfactorias bajo un método de análisis robusto y efectivo, minimizando el número de pasos y de reactivos

utilizados, y por lo tanto minimizando también las pérdidas asociadas al proceso de extracción [25, 26].

5.3. FACTORES QUE AFECTAN AL PROCESO DE EXTRACCIÓN

A pesar de la sencillez de estas técnicas de extracción, al igual que ocurre con toda metodología analítica, existen diversos factores que afectan a la efectividad del proceso y que han de ser optimizados. Algunos de estos factores son:

5.3.1. Tipo de muestra

El método QuEChERS fue concebido para tratar muestras con un alto porcentaje de humedad, fundamentalmente matrices agrícolas y alimentarias del tipo de frutas o vegetales, en cuyos casos la cantidad de agua presente en la muestra es suficiente para debilitar las interacciones entre analito y matriz y asegurar el paso de los pesticidas al disolvente orgánico de forma satisfactoria.

Sin embargo, esta técnica solamente resultaba aplicable de forma satisfactoria a muestras con un % de humedad superior al 80%. Por lo que multitud de matrices quedaban exentas de ser tratadas con QuEChERS por su falta de humedad. Es el caso de los cereales, frutos secos, harinas o tierras, entre otras. Para estos casos se ha incluido una variación en el método original consistente en añadir agua a la muestra previamente a proceder a la extracción, en proporciones 1:1 o mayores en caso de matrices cuyo contenido en agua sea inferior al 25%.

5.3.2. Homogeneización de la muestra

La técnica de QuEChERS requiere de una porción de muestra muy pequeña en comparación con los métodos de extracción clásicos. En general, se suele analizar entre 5 y 15 gramos, cantidad que debe ser representativa del total de muestra bruta. Por esta razón, se recomienda homogeneizar la muestra hasta lograr el máximo de área superficial para asegurar extracciones eficientes y desarrollar un proceso de extracción que resulte reproducible.

Además como se ha comentado anteriormente, en casos en que el contenido de agua no sea el adecuado, se añadirá un volumen suficiente a la muestra previamente a la extracción. Con ciertas matrices como frutos secos, especias, tierras... en donde el contenido en agua es muy bajo, conviene hacer un pretratamiento de muestra con cantidades superiores (50-100 g) para asegurarse de que la porción extraída se ha homogeneizado debidamente.

5.3.3. Disolventes utilizados en la extracción

Los disolventes más recomendados son **acetonitrilo**, **acetato de etilo** y **acetona**. Teniendo en cuenta que en la técnica de QuEChERS es básica la presencia de agua en una elevada proporción, a priori podría decirse que el disolvente más adecuado es el **acetonitrilo** puesto que se separa mejor del agua que la acetona en presencia de sales. En cuanto al acetato de etilo, si bien tiene como ventaja la inmiscibilidad con el agua, coextrae lípidos y ceras que además de ensuciar los extractos, pueden retener a los compuestos, obteniendo al final recuperaciones más bajas para ciertos pesticidas.

Comparado con la acetona, el uso de acetonitrilo facilita la eliminación del agua residual presente en el extracto orgánico mediante la adición de una sal anhidra como el sulfato de magnesio. Además es un disolvente compatible con las columnas de HPLC. Como contrapunto, hay que indicar que en caso de ser necesario evaporar el extracto de forma parcial para concentrarlo, o de forma total para reconstituirlo con otro disolvente distinto, el acetonitrilo presenta una volatilidad menor por lo que el tiempo de evaporación es mayor usando este disolvente.

5.3.4. Adición de sales y adsorbentes

Las sales se adicionan con el propósito de **modificar el equilibrio de reparto del analito** entre las dos fases, buscando favorecer la migración de los compuestos de interés a la fase orgánica, y también para facilitar la separación entre fases. La concentración de sales en el medio afecta al porcentaje de agua presente en la muestra, de forma que al reducir la fase acuosa se estimula el paso de pesticidas hacia la fase orgánica ayudando a aumentar las recuperaciones.

Por lo tanto el uso de **sulfato de magnesio** produce una migración más efectiva de los compuestos a la fase orgánica. El uso suplementario de **sulfato de sodio** ayuda a controlar la polaridad de los disolventes lo cual influye positivamente en la limpieza de los extractos con

respecto a la matriz, si bien un uso abusivo de esta sal puede influir negativamente en el reparto de los analitos hacia la fase orgánica.

La naturaleza de la matriz y los analitos de interés determinarán el tipo de dispersante a utilizar a la hora de realizar la DSPE para purificar el extracto orgánico. La PSA elimina los azúcares, ácidos orgánicos y ácidos grasos mayormente. Se utiliza combinada con C18, cuando se requiere eliminara lípidos e interferencias no polares de la matriz, o combinada con CGB, si lo que se requiere es la eliminación de pigmentos y esteroides.

Por lo tanto la elección de uno u otro, así como las cantidades utilizadas, dependen de la naturaleza de la muestra.

5.3.5. pH

El pH del medio condiciona no sólo la extracción efectiva de los analitos, sino también la medida en que se produce la coextracción de componentes de la matriz, además de determinar la estabilidad de los pesticidas presentes en la muestra. La mayoría de los pesticidas son estables a pH bajo, aunque en algunos casos el pH de la extracción debe ser controlado y mantenido dentro de unos márgenes.

Para aquellos analitos que se encuentran protonados en medio ácido, el pH ha de mantenerse en un rango entre 2 y 7 unidades, en función de los analitos y la matriz con la que se está trabajando. Si lo que se necesita es incrementar la estabilidad de los pesticidas básicos, una pequeña cantidad de ácido fórmico se añade generalmente antes del paso de clean-up con PSA.

Generalmente, si es necesario controlar el pH, se suele tamponar el medio durante el primer paso del proceso de extracción, con sales de citrato para ajustar el pH en un rango de entre 5 y 5.5, valor de compromiso en donde la mayoría de pesticidas ácidos o básicos están suficientemente estabilizados.

5.4. CONSIDERACIONES PRÁCTICAS

La mayor problemática que presenta esta metodología es la posible interacción de alguno de los pesticidas con los sorbentes y dispersantes en el proceso de DSPE, así como la coextracción de constituyentes de la matriz que suponen una interferencia.

Puede producirse la coextracción de grasas y ceras que se pueden eliminar fácilmente poniendo los extractos en el congelador y separando la fracción precipitada o usando adsorbentes de fase reversa como pueden ser el C8 o C18 en presencia de PSA y $MgSO_4$.

Los pigmentos de la matriz pueden eliminarse con **CGB**; éste tiene estructura plana que hace que ciertos compuestos la misma distribución espacial, tengan afinidad por el CGB y sean arrastrados de la fase orgánica y eliminados del extracto.

Los pesticidas con grupos ácidos interaccionan con las sustancias amino-sorbentes como PSA, que confiere un carácter ligeramente básico a la mezcla. Por ello es frecuente acidificar las muestras en algún punto previo a la etapa de limpieza.

EL $MgSO_4$ en presencia de agua se compacta pudiendo quedar retenida parte de la fase orgánica. Para evitarlo basta con agitar el tubo inmediatamente después de añadir la sal.

5.5. APLICACIONES DE MÉTODOS QuEChERS

Actualmente, debido a las modificaciones aplicadas sobre el método original, multitud de muestras pueden ser tratadas aplicando el método QuEChERS. Resulta un método que da muy buenos resultados en matrices agrícolas con alta carga de agua y también da resultados satisfactorios en matrices grasas, que siempre han generado bastantes problemas a la hora de extraer residuos de pesticidas debido al alto efecto matriz y a la alta retención de los mismos sobre el tejido adiposo.

Recientes publicaciones ponen de manifiesto la posibilidad de aplicar este método a un amplio abanico de matrices. Productos agrícolas o ganaderos; matrices típicas de estudio en el ámbito de la salud alimentaria como leche, cereales, zumos, verduras, huevo o tejidos animales, [25-32], muestras de agua de mar [33], de suelos [34] o muestras biológicas como sangre [35], son buen ejemplo de la variedad de matrices que se pueden tratar usando la extracción en fase sólida dispersiva.

De igual modo existe un amplio rango de compuestos que son extraídos de forma satisfactoria utilizando este método: fenoxi-ácidos, carbamatos, pesticidas organofosforados y organoclorados, sulfonamidas, y distintos fármacos [26, 32, 35-40].

5.6. FUTURO DE LOS QuEChERS

Cada día son más las muestras que se tratan con este método de extracción. Al principio se aplicaba sobre todo a muestras agrícolas y de alimentación, pero en los últimos años se han llevado a cabo estudios de pesticidas y toxinas no relacionadas con la comida como puede ser la acrilamida o también para la determinación de drogas en sangre. En cada caso, la técnica ha de ser adaptada a los requerimientos de las muestras

En el año 2007, la AOAC presentó un método oficial para la extracción de pesticidas en muestras alimentarias bajo el nombre: *“2007.01 Method: Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate”* basado en un método QuEChERS. Esta metodología ha sido aprobada también por la Unión Europea con el método de análisis prEN-15662 [42, 43].

6. BIBLIOGRAFÍA.

[1] Consalter, A.; Guzzo, V.; Multiresidue analytical method for organophosphate pesticides in vegetables; *Fresen. J. Anal. Chem*; 339, **1991**, pp. 390-394

[2] Nardelli, V.; Palermo, C.; Centonze, D.; Rapid multiresidue extraction method of organochlorinated pesticides from fish feed; *J. Chromatogr. A*; 1034, **2004**, pp. 33-40.

[3] Rocío, A.; Pedro, V.; Extracción de sustancias asistida por ultrasonido (EUA). *Tecnología en Marcha*; 20, **2007**, pp. 30-40

[4] Palma, M.; Barroso, C.; Ultrasound-assisted extraction and determination of tartaric and malic acids from grapes and winemaking by-products; *Anal. Chim. Acta*; 458, **2001**, pp. 119-130.

[5] Cabredo, S.; Cedrón-Fernández, T.; González-Briongos, M.; Puente-Pascual, L. y Sáenz-Barrio, C.; Ultrasound assisted extraction of *volatile* compounds from wine samples: Optimisation of the method; *Talanta*; 69, **2006**, pp. 1123-1129.

[6] Rostagno, M.; Palma, M.; Barroso, C. Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones; *J. Chromat. A*; 1012, **2003**, pp. 119-128.

[7] Díaz-Ortiz, A.; de la Hoz, A.; Langa, F.; Moreno, A.; Técnicas no convencionales en química, *Anales de la RSEQ*; 95, **1999**, pp. 17-28.

[8] Camel, V.; Microwave-assisted solvent extraction of environmental samples; *TrAC*; 19, **2000**, pp. 229-248.

[9] Sanchez-Prado, L.; Garcia-Jares, C.; Llompart, M.; Microwave-assisted extraction: Application to the determination of emerging pollutants in solid samples; *J. Chromatogr. A*; 1217, **2010**, pp. 2390-2414.

[10] Tipler, P.; Mosca, G.; *Electricidad y magnetismo*. En "Física para la ciencia y la tecnología: volumen 2"; Freeman and Company (Nueva York, USA); **2005**, pp. 626-627

[11] Guide to Solid Phase Extraction, Supelco < <http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4538.pdf> > (Consulta: 27-02-10)

[12] Sorgob, M.; Vilanova, E.; *Preparación de muestras*. En “Técnicas analíticas de contaminantes químicos: aplicaciones toxicológicas, medioambientales y alimentarias”; Ediciones Díaz de Santos (Madrid, España), **2004**, pp. 27-37.

[13] Hyötyläinen, T.; Principles, developments and applications of on-line coupling of extraction with chromatography; *J. Chromatogr. A*; 1153, **2007**, pp. 14-28

[14] Hennion, M.-C.; Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography; *J. Chromatogr. A* ; 856, **1999**, pp. 3-54.

[15] Ibáñez, M.; Pozo, O.; Sancho, J.; López, F.; Hernández, F.; Residue determination of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid in water and soil samples by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry; *J. Chromatogr. A*; 1081, **2005**, pp. 145-155.

[16] Pozo, O.; Guerrero, C.; Sancho, J.; Ibáñez, M.; Pitarch, E.; Hogendoorn, H.; Hernández, F.; Efficient approach for the reliable quantification and confirmation of antibiotics in water using on-line solid-phase extraction liquid chromatography/tandem mass spectrometry; *J. Chromatogr. A* , 1103, **2006**, pp.83-93.

[17] Marín, M.; Sancho, J.; Pozo, O.; López, F.; Hernández, F.; Quantification and confirmation of anionic, cationic and neutral pesticides and transformation products in water by on-line solid phase extraction–liquid chromatography–tandem mass spectrometry; *J. Chromatogr. A* , 1133, **2006**, pp.204-214

[18] Pestek, J.; Matyska, M.; *SPE Sorbents and Formats*. En “Solid-phase extraction: principles, techniques, and applications”; Simpson, N.; Ed. Marcel Dekker (Nueva York, USA); **2000**, pp.19-33

[19] Barker, S.; Matrix solid-phase dispersion; *J. Chromatogr. A*, 885, **2000**, pp. 115-127.

[20] Capriotti, A.; Cavaliere, C.; Giansanti, P.; Gubbiotti, R.; Samperi, R.; Laganà, A.; Recent developments in matrix solid-phase dispersion extraction, *J. Chromatogr. A*; 1217, **2010**, pp. 2521 – 2532.

[21] Barker, S.; Long, A.; Short C.; Isolation of drug residues from tissues by solid phase dispersion; *J. Chromatogr. A*; 475, **1999**, pp. 353-361.

[22] Barker, S.; Matrix solid-phase dispersion (MSPD); *J. Biochem. Biophys. Methods*; 70, **2007**, pp. 151-162.

[23] Anastassiades, M.; Lehotay, S.; Stajnbaher, D.; Schenck, F.; Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce; *J AOAC Int.*; 86, **2003**, pp. 412-431.

[24] Schenck, F.; Hobbs, J.; Evaluation of the Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe (QuEChERS) Approach to Pesticide Residue Analysis; *Bullet. Environ. Contam. Toxicol.*; 73, **2004**, pp. 24-30.

[25] Kinsella, B.; Lehotay, S.; Mastovska, K.; Lightfield, A.; Furey, A.; Danaher, M.; New method for the analysis of flukicide and other anthelmintic residues in bovine milk and liver using liquid chromatography–tandem mass spectrometry; *Anal. Chim. Acta*; 637, **2009**, pp.196-207.

[26] Keegan, J.; Whelan, M.; Danaher, M.; Crooks, S.; Sayers, R.; Anastasio, A.; Elliott, C.; Brandon, D.; Furey, A.; O’Kennedy, R.; Benzimidazole carbamate residues in milk: Detection by Surface Plasmon Resonance-biosensor, using a modified QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) method for extraction; *Anal. Chim. Acta*; 654, **2009**, pp.111-119.

[27] Lehotay, S.; Mastovská, K.; Yun, S.; Evaluation of two fast and easy methods for pesticide residue analysis in fatty food matrixes; *J. AOAC Int.*;88, **2005**, pp. 630-638.

[28] Sospedra, I.; Blesa, J.; Soriano, J.; Mañes, J.; Use of the modified quick easy cheap effective rugged and safe sample preparation approach for the simultaneous analysis of type A- and B-trichothecenes in wheat flour; *J. Chromatogr. A*; 1205, **2008**, pp.10-16.

[29] Prado, R.; Marcilio, K.; Verdiani, S.; Determination of pesticides in sugarcane juice using the quick, easy, cheap, effective, rugged and safe (QuEChERS) sample preparation; *Toxicol. Lett.*; 180, **2008**, pp. S75. Comunicación en “45th Congress of the European Societies of Toxicology EUROTOX 2008 NewGeneris Workshop”

[30] Nguyen, T.; Yu, J.; Lee, D.; Lee, G.-H.; A multiresidue method for the determination of 107 pesticides in cabbage and radish using QuEChERS sample preparation method and gas chromatography mass spectrometry; *Food Chem.*; 110, **2008**, pp.207-213.

[31] Koesukwiwat, U.; Sanguankaew, K.; Leepipatpiboon, N.; Rapid determination of phenoxy acid residues in rice by modified QuEChERS extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 626, **2008**, pp.10-20.

[32] Posyniak, A.; Zmudzki, J.; Mitrowska, K.; Dispersive solid-phase extraction for the determination of sulfonamides in chicken muscle by liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*; 1087, **2005**, pp.259-264.

[33] Hamid Reza Sobhi, Amir Kashtiaray, Hadi Farahani, Majid Javaheri, Mohammad Reza Ganjali. Quantitation of mononitrotoluenes in aquatic environment using dispersive liquid–liquid microextraction followed by gas chromatography–flame ionization detection; *J. Hazard. Mat*; 175, **2010**, pp. 279-283

[34] García, C.; Fernández, M.; Herrero, S.; Casas, A.; Pérez, J.; Moreno, B.; Simplified QuEChERS approach for the extraction of chlorinated compounds from soil samples. *Talanta*; 81, **2010**, pp. 385-391.

[35] Plössl, F.; Giera, M.; Bracher, F.; Multiresidue analytical method using dispersive solid-phase extraction and gas chromatography/ion trap mass spectrometry to determine pharmaceuticals in whole blood. *J. Chromatogr. A*; 1135, **2006**, pp.19-26.

[36] Payá, P.; Anastassiades, M.; Mack, D.; Sigalova, I.; Tasdelen, B.; Oliva, J.; Barba, A.; Analysis of pesticide residues using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method in combination with gas and liquid chromatography and tandem mass spectrometric detection; *Anal. Bioanal. Chem.*; 389, **2007**, pp. 1697-1714.

[37] Garrido, A.; Martínez, J.; Pastor-Montor, E.; Romero-González, R.; High-throughput determination of pesticide residues in food commodities by use of ultra-performance liquid-chromatography-tandem mass spectrometry; *Anal. Bioanal. Chem.*; 390, **2008**, p. 947-959.

[38] Fagerquist, C.; Lightfield, A.; Lehotay, S.; Confirmatory and Quantitative Analysis of β -Lactam Antibiotics in Bovine Kidney Tissue by Dispersive Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chem.*; 77, **2005**, pp. 1473–1482.

[39] Stubbings, G.; Bigwood, T.; The development and validation of a multiclass liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) procedure for the determination of veterinary drug residues in animal tissue using a QuEChERS (QUick, Easy, CHEap, Effective, Rugged and Safe) approach; *Anal. Chim. Acta*; 637, **2009**, pp. 68-78.

[40] Aguilera-Luiz, M.; Martínez, J.; Romero-González, R.; Garrido, A.; Multi-residue determination of veterinary drugs in milk by ultra-high-pressure liquid chromatography–tandem mass spectrometry; *J. Chromatogr. A*; 1205, **2008**, pp.10-16.

[41] Kinsella, B.; O'Mahony, J.; Malone, E.; Moloney, M.; Cantwell, H.; Furey, A.; Danaher, M.; Current trends in sample preparation for growth promoter and veterinary drug residue analysis. *J. Chromatogr. A*; 1216, **2009**, pp.7977-8015.

[42] AOAC Official Method 2007.01, "Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate."

[43] prEN 15662, versión 2007-10-24, Foods of Plant Origin – Determination of Pesticide Residues Using GC-MS and/or LC-MS/MS following Acetonitrile Extraction/Partitioning and Clean-up by Dispersive SPE (QuEChERS-method).

II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS



La evolución de la Agricultura con la introducción de las prácticas intensivas llevó implícita la necesidad de la **utilización masiva de agroquímicos**. Se liberaron entonces de forma descontrolada una gran cantidad de sustancias al medio sin haber evaluado las consecuencias que podrían tener para el medioambiente. La realidad es que cada vez hay un mayor número de pesticidas que tienen efectos dañinos sobre la salud humana y el medio, puesto que presentan en muchos casos unos altos índices de **toxicidad** y **persistencia** y en ocasiones se transforman en sustancias más nocivas que aquellas de las que provienen. En este sentido, medioambiente y agricultura están estrechamente ligados: el primero se ve seriamente afectado por el uso de sustancias que benefician a la segunda.

Esta situación ha provocado la introducción de continuas **regulaciones** y **restricciones** a nivel nacional e internacional para asegurar unos **niveles máximos de residuos** para sustancias que pueden resultar dañinas. Estas normas están en constante actualización y evolucionan a la par que la agricultura, las prácticas agrícolas y la situación a nivel de contaminación medioambiental y seguridad alimentaria [1 - 5]

Se hace por lo tanto imprescindible el desarrollo de **metodologías analíticas efectivas** para determinar residuos de pesticidas en diversas matrices, y evaluar tanto la presencia como la cantidad de residuos de los mismos. Asimismo, es de vital importancia conocer cómo afectan éstos a las especies presentes en el entorno y al medio que los rodea.

Conviene tomar **una perspectiva más general** y no olvidar la conexión que existe entre matrices **medioambientales, alimentarias** y **agrícolas**: los cultivos agrícolas como maíz, cebada, alfalfa o soja destinados a la producción de alimento para el ganado (piensos y ensilados), así como los pastos o forrajes, en su mayoría han sido tratados con agroquímicos en mayor o menor medida, de forma que, por vía trófica, estas sustancias pueden migrar y llegar a los niveles más altos de la cadena alimenticia. Además los suelos en donde crecen estos cultivos contienen en ocasiones residuos de pesticidas persistentes que son susceptibles de alcanzar cultivos o ser arrastrados a otros estratos medioambientales si las condiciones climatológicas son propicias.

Es por ello que el trabajo que se presenta se ha focalizado en dos ejes básicos de estudio: **seguridad alimentaria** y **contaminación medioambiental**. En lo relativo al primero de ellos, se ha centrado el estudio por una parte en la leche de vaca, puesto que representa, junto con sus derivados, uno de los productos básicos para el consumo humano. Con ello se pretende evaluar el **impacto de la aplicación de los pesticidas** más utilizados en explotaciones de ganado bovino de Galicia, estimando a la vez el estado de la leche de vacuno. Por otra parte se han analizado muestras recogidas en colmenas (miel y polen), para determinar la presencia de residuos de pesticidas tóxicos para las abejas, siempre desde la perspectiva del impacto que origina el uso de agroquímicos, en el marco de un proyecto pluridisciplinar

centrado en la problemática que ha supuesto el síndrome de despoblamiento de las colmenas para la comunidad apícola gallega.

En cuanto al aspecto de **contaminación medioambiental**, se ha llevado a cabo la evaluación de la presencia de pesticidas en las cuencas de los ríos Xallas y Miño, seleccionados por hallarse en un entorno geográfico en donde se ubican un gran número de explotaciones de ganado vacuno. Esta parte del estudio se ve complementada por el análisis de muestras de suelos de explotaciones ganaderas de la misma cuenca del río Xallas, para relacionar la presencia de residuos de pesticidas aplicados en las mismas con la contaminación de distintos compartimentos medioambientales (por efecto de contaminación difusa).

Para cumplir con estos objetivos se han desarrollado metodologías de análisis de fácil aplicación, suficientemente selectivas y sensibles para determinar la presencia de contaminantes en las matrices agrícolas y alimentarias como **leche, miel, aguas superficiales y suelos agrícolas**. Se han puesto a punto distintos métodos de tratamiento de muestra y de análisis multirresduo de acuerdo con las normativas europeas [6-8], que permiten la determinación de un amplio número de pesticidas pertenecientes a distintas familias químicas, como son:

Organofosforados: se han estudiado 10 compuestos, una parte de los cuales se emplean en nuestra Comunidad Autónoma como insecticidas.

Triazinas: se ha llevado a cabo la determinación de 8 de estos pesticidas (y 3 de sus metabolitos) que se utilizan como herbicidas, comúnmente aplicados a cultivos de cereales como el maíz, ampliamente cultivado en Galicia.

Ureas y uracilos: se han investigado un uracilo y 12 ureas, todas ellas aplicadas como herbicidas a excepción de una aplicada como insecticida.

Piretroides: se ha planteado un método para evaluar la presencia un total de 10 pesticidas piretroides en muestras de suelo.

Pesticidas derivados de ácido acético y propanoico: en este caso se ha llevado a cabo la determinación de 7 herbicidas ácidos, muy comunes en praderas, entre ellos el 2,4D y MCPA ampliamente utilizados a nivel mundial.

Otros contaminantes heterocíclicos: además de los anteriores se han estudiado 6 amidas sustituidas (5 acetamidas y una propanamida); 2 pesticidas nicotinoides; un fenilpirazol, el fipronil, junto con 4 de sus metabolitos; 2 compuestos pertenecientes a la familia de los nitrilos; y otros 8 pesticidas que presentan heterociclos como fenilos, diazinonas, piridazonas, benzofuranos o grupos clorofenoxi.

Esto representa un total de **74 compuestos** que han sido determinados mediante **cromatografía de líquidos o de gases** acoplada en ambos casos a **espectrometría de masas en tándem**. Se emplearon dos dispositivos de gran sensibilidad analítica lo que permitió el desarrollo de métodos muy sensibles que cumplen con creces con los requerimientos legales en cuanto a desarrollo de metodologías analíticas y que permiten **determinar residuos de pesticidas** legislados **muy por debajo de los niveles permitidos**.

En todo el proceso de desarrollo de métodos, quizás la parte más importante sea la de preparación de muestra, esto es, pretratamiento de las mismas y extracción. Del desarrollo de un buen método de extracción depende la eficiencia del método analítico desarrollado en cuanto a su aplicación a muestras reales. El interés radica en diseñar una metodología que siendo sencilla resulte eficaz y reproducible sin generar mucho consumo de tiempo y material, y que permita determinar un amplio número de compuestos de distinta naturaleza.

Para ello se han utilizado en esta Tesis distintas técnicas de preparación de muestra como puede ser la **SPE, MSPD, DSPE** o **MAE** que permiten tratar matrices complejas como las que se manejan en este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

[1] Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council of 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/EEC

[2] Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council of 7 May 2002 on undesirable substances in animal feed. *Off. J. Eur. Comm.*, L140/10, **2002**.

[3] Commission Regulation (EC) No. 839/2008 amending Regulation (EC) No. 396/2005 of the European Parliament and of the Council as regards Annexes II, III and IV on maximum residue levels of pesticides in or on certain products. *O Off. J. Eur. Comm* L 234, **2008**, pp. 1-216.

[4] Ministerio de la Presidencia de España (2005) Real Decreto 9/2005, BOE 15/2005, 1833-1843.

[5] Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council of 16th December 2008 on environmental quality standards in the field of water policy; *Off. J. Eur. Comm*, L 348 **2008** pp. 0084 – 0097.

[6] Commission Decision 97/747/EC of 27 October 1997 fixing the levels, frequencies of sampling provided for by Council Directive 96/23/EC for the monitoring of certain substances, residues thereof in certain animal products.

[7] Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods, the interpretation of results, *Off. J. Eur. Comm*, L 221, 2002, 8 – 36.

[8] Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed. document No. SANCO/10684/2009

III. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL



1. PATRONES	- 106 -
2. REACTIVOS, GASES Y DISOLVENTES.....	- 109 -
2.1 DISOLVENTES	- 109 -
2.2 GASES.....	- 109 -
2.3 REACTIVOS	- 110 -
3. INSTRUMENTAL	- 110 -
3.1. AGITACIÓN Y SEPARACIÓN.....	- 110 -
3.2. BALANZAS	- 111 -
3.3. MATERIAL DE USO GENERAL EN EL LABORATORIO	- 111 -
3.4 MATERIAL ESPECÍFICO PARA SPE Y MSPD	- 111 -
3.5. MEDIDAS DE VOLUMEN	- 112 -
3.6. REFRIGERACIÓN Y SECADO	- 112 -
3.7. MATERIALES Y SISTEMAS DE EXTRACCIÓN	- 112 -
3.8. EQUIPO DE CONCENTRACIÓN Y SEPARACIÓN.....	- 113 -
3.9. VIALES.....	- 113 -
3.10. MUESTREO Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS.....	- 113 -
4. PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES DE TRABAJO.....	- 113 -
4.1. DISOLUCIONES STOCK, PATRONES DE CALIBRADO Y MEZCLAS DE FORTIFICACIÓN.....	- 113 -
4.2. PREPARACIÓN DE FASES MÓVILES.	- 115 -
5. ACONDICIONAMIENTO Y LIMPIEZA DEL MATERIAL	- 116 -
5.1. PROTOCOLOS DE LIMPIEZA.....	- 116 -
5.2. ACONDICIONAMIENTO DE REACTIVOS.....	- 116 -
6. GESTIÓN DE RESIDUOS.....	- 116 -

En este capítulo se incluye una relación de los patrones individuales y las mezclas de pesticidas utilizados, así como los medios empleados (reactivos y material) para la realización de la parte experimental de los distintos apartados incluidos en esta memoria. En el siguiente capítulo (IV. Discusión y resultados) se especifican, para cada caso en particular, las muestras analizadas incluyendo su pretratamiento, el modo en que se han realizado las adiciones de los analitos sobre ellas y detallando el protocolo de extracción así como las condiciones de análisis.

1. PATRONES

Los nombres comunes de los analitos determinados en los distintos apartados de esta Tesis se listan en la Tabla III.1. Dado que se ha trabajado con métodos multiresiduo, se ha utilizado una gran cantidad de compuestos que fueron suministrados en mezclas comerciales. Se detallan a continuación los estándares individuales y las mezclas empleadas, junto con una relación de los compuestos que pertenecen a cada una de ellas (tabla III.2).

Tabla III.1. Relación de los estándares individuales y las mezclas técnicas utilizadas.

Compuesto o mezcla	Pureza	Estado	Concentración	Suministrador
Estándares individuales				
Acetocloro	99,2	Sólido	0,1 g	Riedel-de Haën
Alacloro	99,5	Sólido	0,25 g	Dr. Ehrenstorfer (Augsburgo, Alemania)
Bioaletrina	99,3	Disolución en iso-octano	100 mg L ⁻¹	Dr. Ehrenstorfer (Augsburgo, Alemania)
Bifentrina	98,8	Disolución en iso-octano	100 mg L ⁻¹	Dr. Ehrenstorfer (Augsburgo, Alemania)
Cifenotrina	99,5	Disolución en ciclohexano	10 mg L ⁻¹	Dr. Ehrenstorfer (Augsburgo, Alemania)
Cipermetrina	99,3	Disolución en iso-octano	100 mg L ⁻¹	Dr. Ehrenstorfer (Augsburgo, Alemania)
Dimetanamida-P	99,2	Sólido	0,1 g	Riedel-de Haën (Hanóver, Alemania)
Empentrina	99,1	Disolución en ciclohexano	100 mg L ⁻¹	Dr. Ehrenstorfer (Augsburgo, Alemania)
Fipronil	98,4	Sólido	0,10 g	Institute of organic industrial chemistry (Varsovia, Polonia)
Fipronil carboxamida	96,5	Solución	100 mg L ⁻¹	Dr. Ehrenstorfer (Augsburgo, Alemania)
Fipronil desulfenil	96,5	Solución	100 mg L ⁻¹	Dr. Ehrenstorfer (Augsburgo, Alemania)

Compuesto o mezcla	Pureza	Estado	Concentración	Suministrador
Fipronil sulfuro	99,0	Sólido	0,025 g	Dr. Ehrenstorfer (Augsburgo, Alemania)
Fipronil sulfona	99,0	Sólido	0,05 g	Dr. Ehrenstorfer (Augsburgo, Alemania)
Imidacloprid	98,0	Sólido	0,1g	Dr. Ehrenstorfer (Augsburgo, Alemania)
Lambda-Cihalotrina	99,4	Disolución en ciclohexano	100 mg L ⁻¹	Dr. Ehrenstorfer (Augsburgo, Alemania)
Lufenurón	99,2	Sólido	0,1 g	Dr. Ehrenstorfer (Augsburgo, Alemania)
Metalaxil	99,7	Sólido	0,25 g	Institute of organic industrial chemistry (Varsovia, Polonia)
Metil pirimifós	98,2	Líquido	0,25 g	Institute of organic industrial chemistry (Varsovia, Polonia)
Permetrina	99,2	Disolución en ciclohexano	100 mg L ⁻¹	Dr. Ehrenstorfer (Augsburgo, Alemania)
Teflutrina	99,4	Disolución en acetonitrilo	100 mg L ⁻¹	Dr. Ehrenstorfer (Augsburgo, Alemania)
Tetrametrina	99,2	Disolución en ciclohexano	10 mg L ⁻¹	Dr. Ehrenstorfer (Augsburgo, Alemania)
Transflutrina	99,5	Disolución en ciclohexano	100 mg L ⁻¹	Dr. Ehrenstorfer (Augsburgo, Alemania)
Tiametoxam	99,7	Sólido	0,1 g	Riedel-de Haën
Estándares de compuestos marcados isotópicamente				
[² H ₃]-Atrazina	99,0	Sólido	0,05 g	CDN Isotopes (Quebec, Canada)
[² H ₁₀]-Clorpirifós	96,5	Disolución en acetona	100 mg L ⁻¹	Dr. Ehrenstorfer
[² H ₄]-Imidacloprid	98,0	Disolución en acetona	100 mg L ⁻¹	Dr. Ehrenstorfer
[² H ₃]-Mecoprop	99,0	Sólido	0,01 g	Dr. Ehrenstorfer
Mezclas técnicas				
NE 7500		Disolución en acetonitrilo	100 mg L ⁻¹	LCG promochem Wesel, Alemania)
NE 7555		Disolución en metanol	10 mg L ⁻¹	LCG promochem Wesel, Alemania)
NE 2530		Disolución en acetonitrilo	100 mg L ⁻¹	LCG promochem Wesel, Alemania)

Los compuestos marcados con deuterio se emplearon como subrogado o como patrón interno.

Por otra parte la reserpina y 1,3,6-Tirosina, suministradas por Thermo Fisher Scientific con la adquisición del LC-MS/MS, se emplearon en la puesta a punto y del detector de masas Quantum Access según especificaciones del fabricante.

Tabla III.2. Composición de las mezclas de compuestos.

Mezcla	Pureza	Compuesto	Mezcla	Pureza	Compuesto
2530	99	2,4-D	7500	99	Isoproturón
2530	99	Bentazona	7500	99	Linurón
2530	98	Bromoxinil	7500	99	Metabenzthiazurón
2530	99	Diclorprop	7500	99	Metabromurón
2530	99	Dinoterb	7500	99	Metamitrona
2530	97	Fluazifop	7500	99	Metazacloro
2530	99	Fluroxipir	7500	99	Metolacloro
2530	99	Haloxifop	7500	99	Metoxurón
2530	99	Ioxinil	7500	99	Monolinurón
2530	99	MCPA	7500	99	Prometrina
2530	99	Mecoprop	7500	99	Propazina
2530	99	Quinmerac	7500	99	Simazina
2530	99	Sulcotriona	7500	99	Terbutilazina (TBA)
7500	99	Atrazina	7500	99	Terbutrina
7500	99	Bromacil	7555	99	Clorfenvinfós
7500	99	Carbetamida	7555	99	Clorpirifós
7500	99	Cianazina	7555	99	Diazinón
7500	99	Cloridazón	7555	99	Fenitrotión
7500	99	Cloroxurón	7555	99	Fosalona
7500	99	Clortolurón	7555	99	Malatión
7500	99	Deisopropilatrazina (DIA)	7555	99	Metil clorpirifós
7500	99	Desetilatrastina (DEA)	7555	99	Mevinfós
7500	99	Desetilterbutilazina (DETBA)	7555	99	Triadimefón

Mezcla	Pureza	Compuesto	Mezcla	Pureza	Compuesto
7500	99	Dimefurón	7555	80	Triazofós
7500	99	Diurón			
7500	99	Etidimurón			
7500	99	Etofumesato			

2. REACTIVOS, GASES Y DISOLVENTES

2.1 DISOLVENTES

Todos los disolventes utilizados han sido suministrados por J.T.Backer:

Agua, grado HPLC.

Metanol, grado HPLC.

Acetonitrilo, grado HPLC.

Acetato de etilo, grado residuo.

Diclorometano, grado residuo.

Acetona, grado residuo.

Hexano, grado residuo.

Agua ultrapura (Milli-Q), obtenida en el propio laboratorio con un sistema de purificación (Millipore), utilizada para el lavado del material.

Acetona de baja calidad para la limpieza del material.

2.2 GASES

Nitrógeno seco (Carbuos Metálicos) usado para evaporar.

Nitrógeno ultrapuro, obtenido en el propio laboratorio con un sistema de generación utilizado para las corrientes de gas del LC-MS/MS

Argón 6.0 (Carburos Metálicos) empleado en el LC-MS/MS

Helio 99,999% (Carburos Metálicos) usado como gas portador para el GC-MS/MS

2.3 REACTIVOS

Ácido acético, grado HPLC (J.T. Backer).

Ácido nítrico (J.T. Backer).

Ácido fórmico, calidad LC-MS (J.T. Backer).

Formiato amónico ultrapuro, calidad LC-MS (Fluka)

Sulfato sódico anhidro, 99% (Sigma-Aldrich).

Sulfato de magnesio anhidro, 97% (Fluka)

2.3.1. Adsorbentes para SPE y MSPD.

Florisil, 60-100 mesh (Aldrich).

Supelclean PSA (amina primaria y secundaria) SPE, 38-35 μm (Supelco).

Discovery DSC-18 (Supelco)

Superclean Envicarb (Supelco)

3. INSTRUMENTAL

3.1. AGITACIÓN Y SEPARACIÓN

Agitador magnético con placa calefactora modelo Jenway 1000 (Jenway)

Vortex (IKA MS3 Basic).

Centrífuga Allegra X-22R (Beckman Coulter).

3.2. BALANZAS

Balanza analítica, ACCULAB con 4 cifras decimales (Sartorius).

Granatario, ACCULAB con 2 cifras decimales (Sartorius).

3.3. MATERIAL DE USO GENERAL EN EL LABORATORIO

Material de vidrio de uso habitual en el laboratorio.

Botellas de 250 y 500 mL de Pyrex.

Espátulas metálicas.

Tubos de propileno de 15 y 50 mL (Falcon).

Jeringas de polietileno BD-DISCARDIT™ II (10 mL) y BD-Plastipack™ (10mL).

Filtros de jeringa de PTFE, MINISART SPR 0,45 µm, 33 mm (SARTORIUS).

Membranas de celulosa de 0,45 µm (Sartorius).

Agitadores magnéticos.

Embudo de filtración con filtro poroso y kitasato (Nahita).

Pipeta Pasteur de vidrio.

Puntas de pipeta de 10 mL, 100-1000 µL, 10-300 uL, 10-200 uL, 2-20 µL (Thermo Fisher Scientific y Finntip®).

Papel de aluminio.

Termómetro de mercurio, con escala de 0 a 150 °C.

Soportes, pinzas y nueces.

Cronómetro.

Guantes de nitrilo y de látex.

Film de laboratorio (Parafilm).

3.4 MATERIAL ESPECÍFICO PARA SPE Y MSPD

Cartuchos de SPE: Alumina N, Florisil, Silica y C18 Sep-Pak (Waters).

Columnas de SPE HLB OASIS 200cc (Waters).

Columnas de SPE de Carbono grafitizado, Carboprep 200 (Resprep).

Sistema de vacío de 12 puertos, Visiprep y accesorios (Supelco)

Mortero y pistilo de cerámica.

Cartuchos de MSPD con frita INTERCHROM (INTERCHIM).

Fritas para cartuchos de MSPD INTERCHROM (INTERCHIM).

3.5. MEDIDAS DE VOLUMEN

Micropipetas automáticas fijas y variables de diferentes volúmenes (Finnpipette, Thermo Fisher Scientific).

Pipeta automática variable de 1-10 mL (Finnpipette, Thermo Fisher Scientific).

Matraces aforados de 250 y 500 mL para la preparación de fases móviles.

3.6. REFRIGERACIÓN Y SECADO

Nevera a una temperatura de +4 °C o inferior.

Congelador a una temperatura de -20 °C o inferior.

Desecador.

Estufa.

3.7. MATERIALES Y SISTEMAS DE EXTRACCIÓN

Sistema de extracción asistida por microondas ETHOS 1 (MILESTONE)

Baño de ultrasonidos JP Selecta 512 (JP-Selecta).

3.8. EQUIPO DE CONCENTRACIÓN Y SEPARACIÓN

Miniconcentrador por corriente de nitrógeno “Mini-Vap” y accesorios (CRS).

Centrífuga Allegra X-22R (Beckman Coulter)

3.9. VIALES

Viales de 1,8 mL de rosca, transparentes y ámbar (GTG).

Viales de fondo cónico de volumen reducido (GTG)

Insertos de vidrio para volúmenes inferiores a 200 μ L (GTG)

Tapones de rosca y septa de PTFE/silicona para viales de 1,8 mL (GTG)

Viales de vidrio (10, 22 mL) con sus correspondientes cápsulas de aluminio y septa de butilo (Teknokroma).

Encapsulador 20 mm (Restek).

3.10. MUESTREO Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Botes de análisis esterilizados de 50 mL.

Botellas ámbar de 500 mL.

Bolsas de plástico con cierre hermético de distinta capacidad.

4. PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES DE TRABAJO

4.1. DISOLUCIONES STOCK, PATRONES DE CALIBRADO Y MEZCLAS DE FORTIFICACIÓN.

Tanto la preparación de soluciones a partir de estándares comerciales sólidos, como las diluciones de las mismas, de los patrones individuales y mezclas técnicas en solución, se

realizaron siempre por pesada y se conservaron a -20°C en ausencia de luz durante períodos variables de tiempo en función de la concentración del preparado.

4.1.1. Soluciones utilizadas en investigaciones desarrolladas con el LC-MS/MS

Todas las soluciones utilizadas en estudios realizados con el LC-MS/MS, tanto a nivel de fortificación como de preparación de disoluciones stock, fueron realizadas en **metanol**.

Partiendo de los **patrones individuales** comercializados en forma sólida, se prepararon por pesada soluciones madre en metanol a una concentración de $1000\ \mu\text{g mL}^{-1}$, a partir de las cuales, mediante sucesivas diluciones, se obtuvieron **soluciones stock a $10\ \mu\text{g mL}^{-1}$** . Los patrones comerciales en solución (de concentración $100\ \mu\text{g mL}^{-1}$) y las mezclas técnicas **NE-7500** y **NE-2530** se diluyeron en metanol hasta esta misma concentración, que es la que presenta también la mezcla comercial **NE-7555**. A partir de este punto, se obtuvieron por combinación, distintas soluciones de trabajo conteniendo todos los analitos objeto de estudio.

Para la investigación llevada a cabo sobre las muestras de **agua** y de **leche**, se generó una mezcla a una concentración de $1\ \mu\text{g mL}^{-1}$, a partir de la cual se preparan tanto las mezclas de fortificación necesarias, como una solución de $50\ \text{ng mL}^{-1}$ para preparar los patrones de calibrado.

En lo relativo al estudio de muestras de **miel**, el procedimiento es el mismo, con la salvedad de que en este caso el imidacloprid estuvo presente en las soluciones finales en una concentración 5 veces superior al resto de analitos. Se prepararon soluciones intermedias a $2\ \mu\text{g mL}^{-1}$ para imidacloprid y $0,3\ \mu\text{g mL}^{-1}$ para el resto de compuestos, y a partir de ellas se generaron mezclas para fortificación en metanol, de diversas concentraciones según el caso.

En el caso de preparación de patrones para rectas de calibrado o de adición, se partió de una mezcla de concentración $200\ \text{ng mL}^{-1}$ de imidacloprid y $40\ \text{ng mL}^{-1}$ del resto de compuestos, preparada en metanol:agua (3:7) con 0,15% de ácido fórmico y 3mM en formiato amónico. Esta composición es la misma que presenta la fase móvil en el momento de la inyección del patrón en el cromatógrafo de líquidos.

En cuanto a la **localización de los tiempos de retención** y la **optimización de las transiciones SRM**, se prepararon disoluciones a $1\ \mu\text{g mL}^{-1}$ de todos los patrones individuales y mezclas en metanol.

4.1.2 Soluciones utilizadas en investigaciones desarrolladas con el GC-MS/MS

Así mismo, para el estudio de **suelos** las determinaciones se realizaron con un GC-MS/MS; en este caso todas las disoluciones fueron realizadas en acetato de etilo.

Para realizar esta investigación se trabajó con **mezclas técnicas** y con **patrones individuales**. La preparación de las soluciones de trabajo coincide con lo descrito en el punto anterior, es decir, se generó una mezcla a una concentración de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, a partir de la cual se preparan tanto las mezclas de fortificación necesarias, como una solución de 500 ng mL^{-1} para preparar los patrones de calibrado.

4.2. PREPARACIÓN DE FASES MÓVILES.

Las fases móviles utilizadas para realizar los análisis en el LC-MS/MS fueron agua y metanol, ambas tamponadas a pH ácido con ácido fórmico y formiato amónico (0,15% y 3mM respectivamente). La señal analítica del LC-MS/MS resulta muy sensible a cambios en la composición de la fase móvil por lo que, para evitar variaciones en la preparación de las mismas, se usó una solución intermedia de formiato amónico en agua o en metanol a una concentración de 200 mM a partir de la cual se realizó una dilución hasta una concentración de 3mM en matraces aforados de 250 o 500 mL. Se adicionó el volumen pertinente de ácido fórmico para lograr una presencia del mismo al 0,15% del volumen total.

De esta forma se logra tamponar las fases móviles a un pH de 3.05 para el agua y 4.06 para metanol (pH aparente)

Los matraces conteniendo las fases fueron agitados durante 1 ó 2 minutos de forma manual y se transfirieron a los reservorios propios del cromatógrafo. Las vías de succión de la bomba Accela Pump utilizada se purgaron debidamente durante un tiempo de 10 minutos a un flujo de 1 ml/min para asegurar la ausencia de burbujas en el sistema. Dado que la bomba dispone de un desgasificador incluido en el propio sistema, no fue necesario sonicar las fases móviles para desgasificarlas previamente.

Además se usaron también agua y acetonitrilo como fases móviles para llevar a cabo ciclos de limpieza de la columna y de la fuente del detector.

5. ACONDICIONAMIENTO Y LIMPIEZA DEL MATERIAL

5.1. PROTOCOLOS DE LIMPIEZA.

Un buen proceso de limpieza del material reutilizable de plástico y de vidrio es esencial para eliminar el efecto memoria trabajando con residuos a nivel de trazas. Por eso lo que se hace generalmente es lavar con abundante agua y jabón y pasar por último tres aclarados: uno con agua de grifo, otro con agua destilada y un tercero con agua Milli-Q; por último se enjuaga el material con agua HPLC si va a ser utilizado como recipiente para este disolvente y se pasa acetona si se requiere que esté exento de humedad.

El material de teflón de los distintos componentes del extractor de microondas, se lava igualmente con abundante agua, acetona y metanol para arrastrar todos los restos que puedan estar presentes.

Por último, cierto material como agitadores magnéticos o jeringas de inyección manual se lavan en ultrasonidos durante 10 minutos en presencia de una mezcla de metanol:acetona:hexano (1:1:1) para acabar con un segundo lavado con ultrasonidos en metanol.

5.2. ACONDICIONAMIENTO DE REACTIVOS.

En la sección dedicada al estudio de muestras de miel y polen se emplea florisil para realizar extracciones de MSPD. Este compuesto ha de ser acondicionado previamente para eliminar la humedad, manteniéndolo en estufa un mínimo de 12 horas a 120 °C. Pasado este tiempo, el florisil se guarda en un desecador hasta el momento de su utilización.

6. GESTIÓN DE RESIDUOS.

Los residuos generados se clasifican dentro de residuos sólidos o líquidos, y su tratamiento está contemplado dentro del **Plan General de Residuos Estatal**. Los primeros

incluyen, sobre todo, todos los restos de viales y material desechable de laboratorio que ha sido utilizado.

Los residuos líquidos por su parte se dividen en acuosos y orgánicos, distinguiendo en estos últimos entre disolventes halogenados y no halogenados. Se han desechado los restos de muestras de leche fortificadas en un contenedor utilizado exclusivamente para tal efecto.

Todos los contenedores debidamente etiquetados son recogidos y gestionados por los servicios encargados en el centro de investigación.

IV. DISCUSIÓN Y RESULTADOS



IV.A. DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE PESTICIDAS EN LECHE DE VACA.

La contribución en materia de seguridad alimentaria que aporta este capítulo, se centra por una parte en la **determinación de residuos de pesticidas en muestras de leche de vaca**, en un trabajo incluido en el proyecto de investigación **“Evaluación del impacto de contaminantes orgánicos en la calidad de la leche del ganado vacuno”**, aplicando la metodología desarrollada al análisis de muestras de leche de explotaciones gallegas. Parte de las investigaciones realizadas en este campo se han publicado en el artículo **“*Dispersive solid-phase extraction followed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the multi-residue analysis of pesticides in raw bovine milk*”** (*J. Chromatogr A*, 1216, 2009, pp. 3702-3709), que se incluye en los Anexos finales de esta Memoria de Tesis

1. PARTE EXPERIMENTAL.....	- 126 -
1.1. PATRONES EMPLEADOS. PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES...-	126 -
1.2. TOMA DE MUESTRA.	- 127 -
1.2.1. Fortificación de las muestras.	- 127 -
1.3. PROCEDIMIENTOS DE EXTRACCIÓN UTILIZADOS.	- 128 -
1.3.1. SPE.....	- 128 -
1.3.2. QuEChERS.....	- 130 -
1.4. DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN.	- 131 -
2. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	- 132 -
2.1. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS. .-	132 -
2.2. PRUEBAS PREVIAS.	- 134 -
2.2.1. Pruebas con leche fresca semidesnatada comercial.....	- 134 -
2.2.1.1. Diseño experimental.....	- 135 -
2.2.2. Aplicación del método de SPE a leche cruda.	- 138 -
2.2.3. Desarrollo de la metodología de DSPE (QuEChERS).....	- 138 -
2.2.4. Efecto de congelación de las muestras.....	- 145 -
2.2.5. Evaluación del efecto matriz.	- 146 -
2.3. PARÁMETROS DE CALIDAD DEL MÉTODO	- 148 -
2.3.1. Linealidad.	- 148 -
2.3.2. Exactitud y precisión.	- 148 -
2.3.3. Repetibilidad y reproducibilidad.	- 150 -
2.3.4. LODs y LOQs.....	- 151 -
2.4. APLICACIÓN AL ESTUDIO DE MUESTRAS RECOGIDAS EN EXPLOTACIONES GALLEGAS.....	- 153 -
2.5. EVALUACIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN DE PESTICIDAS EN LA LECHE.....	- 155 -
2.5.1 Procedimiento experimental.....	- 155 -

2.5.1.1 Pretratamiento de muestra	- 155 -
2.5.1.2 Fortificación de las muestras.....	- 156 -
2.5.1.3. Aplicación de la DSPE: estudio de recuperación.....	- 157 -
2.5.1.4. Evaluación del reparto de los analitos entre ambas fases.	- 159 -
3. TRABAJOS RELACIONADOS CON LA INVESTIGACIÓN DESARROLLADA.....	- 161 -
4. BIBLIOGRAFÍA.....	- 162 -

Los animales criados en granjas están sujetos a la contaminación por plaguicidas por contacto directo, a través de la ingestión o respiración de aire contaminado, y también mediante transferencia de restos de estos compuestos a través de la cadena trófica.

El ganado bovino dedicado a producción láctea tiene una alimentación basada en pastos, piensos y ensilados (sobre todo de maíz), preparados a partir de cultivos que han podido estar en contacto con fitosanitarios. Dado que la leche de vaca tiene una proporción de grasa bastante alta, resulta interesante plantear la posibilidad de que los pesticidas lipofílicos (gran parte de los estudiados) puedan afectar a la salud humana por migración desde los cultivos hasta el hombre a través de la leche. Se hace necesario regular la utilización de pesticidas y evaluar la presencia de los mismos y de sus metabolitos en leche y productos derivados para garantizar una cantidad de residuos que no supere los niveles de tolerancia recomendados, de manera que el consumo de estos productos no suponga un riesgo para la salud humana. Con tal efecto se han establecido **LMRs** para varios de los agroquímicos utilizados sobre cultivos que pueden afectar a la calidad de la leche, 29 de los cuales pertenecen a compuestos estudiados en este capítulo [1].

Los insecticidas más utilizados solían ser organofosforados en su gran mayoría, pero cuando se puso de manifiesto la alta toxicidad de estos compuestos, fueron sustituidos paulatinamente por piretroides. En cuanto a los herbicidas más ampliamente utilizados, se puede hablar de triazinas, nitrilos, fenilureas, fenoxiácidos, ciclohexanodionas o cloroacetanilidas, entre otras sustancias. Existen diversos estudios que ponen de manifiesto la presencia de estos compuestos en leche y sus derivados; la determinación de organoclorados [2-7], organofosforados [8-11], piretroides [6, 12-13] o triazinas [14-20] son buen ejemplo de la amplia variedad de compuestos que han sido puestos bajo estudio en esta matriz.

Los métodos de preparación de muestra desarrollados para el análisis de residuos de pesticidas en leche incluyen una gran cantidad de técnicas de extracción como extracción líquido-líquido (LLE), extracción en fase sólida (SPE), y más recientemente dispersión de matriz en fase sólida (MSPD) o microextracción en fase sólida (SPME) [21-24]. En cuanto a la detección y cuantificación de los analitos, es frecuente la utilización de técnicas cromatográficas acopladas a detectores de masas (GC-MS/MS y LC-MS/MS) [6, 24-26]

Estudios anteriores se han centrado en la determinación de pesticidas en leche comercial adquirida en supermercados [6, 20, 27]. Sin embargo, de acuerdo con la normativa establecida por la Unión Europea, la **Decisión de la Comisión Europea 97/747/CE** ha fijado los niveles y frecuencias de muestreo previstas en la Directiva 96/23/CE, y en lo referente a leche ha establecido que **las muestras objeto de estudio deben ser cogidas directamente del tanque**, tratándose de leche cruda que no ha sufrido ningún tipo de tratamiento o procesado industrial [28], recogida directamente tras el ordeño. Si bien la leche comercial ha sido ampliamente estudiada, hasta la fecha no son muchas las evaluaciones que se han realizado

sobre leche cruda. Se trata de una matriz más heterogénea que la anterior y presenta un comportamiento químico distinto, por lo que en este aspecto, su estudio presenta un especial interés.

En el trabajo presentado, la determinación de los pesticidas se ha llevado a cabo aplicando un método de tratamiento de muestra llamado extracción en fase sólida dispersiva (DSPE), englobada en los novedosos métodos **QuEChERS** (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged & Safe*) de aplicación reciente, en los que el gasto de material y tiempo de preparación de muestra se ven ampliamente reducidos con respecto a los métodos clásicos, minimizándose las pérdidas de analitos y la contaminación de las muestras durante el proceso de extracción.

Los análisis realizados sobre esta matriz se han visto complementados con la evaluación de residuos de pesticidas piretroides descrito sobre muestras de pienso y leche de las mismas explotaciones, en un trabajo desarrollado por María Fernández Álvarez en el Instituto de Investigación y Análisis Alimentarios (IIAA) de la Universidad de Santiago de Compostela y recogido en la Tesis que lleva por título “*Estudio del comportamiento fotoquímico y determinación de compuestos fitosanitarios en matrices medioambientales y agroalimentarias mediante técnicas avanzadas de extracción y microextracción*”.

1. PARTE EXPERIMENTAL.

1.1. PATRONES EMPLEADOS. PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES.

Los compuestos en los que se centra este capítulo son los siguientes:

Tabla IV.A.1. Compuestos determinados en leche cruda.

Organofosforados	Clorfenvinfós Clorpirifós Diazinón Fosalona Malatión Metil pirimifós Mevinfós Triazofós	Triazinas y metabolitos	Atrazina Cianazina DEA DETBA DIA Metamitrona Prometrina Propazina Simazina Terbutrina Terbutilazina	Ureas sustituidas	Bromacil Cloroxurón Clortolurón Dimefurón Diurón Etidimurón Isoproturón Linurón Metabromurón Metabenzthiazurón Monolinurón
Acetanilidas	Acetocloro Alacloro Carbetamida Metazacloro Metolacloro		Pirazol y Neonicotinoide		Fipronil
Nitrilo	Bromoxinil Ioxinil	Imidacloprid			

La estructura, propiedades y otros datos útiles acerca de estos pesticidas se recogen en el apartado de Anexos.

Debido a la cantidad de analitos que se han tenido en cuenta al plantear el método multirresiduo desarrollado, se hace indispensable trabajar con mezclas de compuestos puesto que la adquisición de estándares individuales de cada uno de ellos es totalmente inviable desde el punto de vista económico. Se ha trabajado pues con la mezcla NE-7500 (triazinas, ureas, carbetamida, metazacloro, cloridazón y triadimefón), NE-7555 (organofosforados), NE-2500 (bentazona, quinmerac, dinoterb, bromoxinil e ioxinil) y patrones individuales de metil pirimifós, acetocloro, alacloro, fipronil e imidacloprid. Además se ha seguido la eficacia de la extracción añadiendo como surrogado [²H₃]-Atrazina a las muestras. Las soluciones de trabajo

se han preparado en su totalidad en metanol a partir de sucesivas diluciones de las soluciones madre, para formar una mezcla de todos los compuestos a una concentración de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$.

1.2. TOMA DE MUESTRA.

Los compuestos en los que se centra la investigación se han seleccionado entre los más ampliamente utilizados en explotaciones gallegas. Para ello las Asociaciones de Criadores de Frisón de A Coruña, Lugo y Pontevedra llevaron a cabo durante la campaña 2005/2006, una encuesta en un total de **478 explotaciones** de estas provincias, elegidas mediante un muestreo estratificado no proporcional partiendo de un total de 16326 explotaciones que fueron agrupadas en función de su producción láctea. De las explotaciones encuestadas **se seleccionaron 23** (pertenecientes a las provincias de Lugo y A Coruña) **en base a los productos fitosanitarios aplicados y a las prácticas agrícolas** seguidas en cada caso (alimentación del ganado propia de ganadería intensiva, extensiva o semiextensiva).

En cada una de las explotaciones, técnicos de la *Cooperativa Agraria Provincial de A Coruña* recogieron una muestra de **medio litro de leche directamente del tanque de frío** (siguiendo las directrices marcadas por la Decisión 97/747 de la Comisión Europea). Las muestras se recolectaron en botellas ámbar que se almacenaron en nevera en caso de análisis en el mismo día de la recepción o sino se congelaron por períodos siempre inferiores a un mes, hasta el día previo al análisis, dejándose descongelar en nevera a 4°C .

Para la realización de pruebas previas y aproximaciones en el desarrollo del método, se ha trabajado sobre leche fresca semidesnatada comercial con un contenido de grasa de 1,5-1,65% (m/v); posteriormente, la optimización y validación se llevó a cabo con leche cruda tomada directamente del tanque de frío del CIAM (Centro de investigaciones Agrarias de Mabegondo), con una composición más heterogénea que la comercial y un porcentaje de grasa evaluado de 3,7% (m/v).

1.2.1. Fortificación de las muestras.

La fortificación de la muestra se llevó a cabo mediante adición de una mezcla que contenía los compuestos en metanol, con volúmenes inferiores al 1% del total. Las muestras fueron homogeneizadas por agitación mecánica y se guardaron en la nevera a 4°C durante una hora para permitir las interacciones entre analito y matriz. Pasado este tiempo, antes de

proceder a la extracción, las muestras fueron homogeneizadas de nuevo mediante agitación manual.

Puesto que no existe material de referencia certificado para estos compuestos en la matriz estudiada, la validación del método se llevó a cabo sobre muestras de leche fortificadas.

1.3. PROCEDIMIENTOS DE EXTRACCIÓN UTILIZADOS.

1.3.1. SPE.

Los pasos previos en la optimización del método desarrollado, se centraron en el trabajo sobre leche comercial desnatada, aplicando un procedimiento convencional de SPE con idea de observar el comportamiento de una muestra más sencilla, para adaptarlo en un paso posterior a la leche cruda introduciendo las variaciones necesarias para esta nueva matriz.

El estudio bibliográfico revela que muchos autores utilizan la SPE para extraer diversos pesticidas en muestras de leche comercial. En los procedimientos descritos, es común diluir la muestra de leche al aplicar esta técnica, para facilitar la percolación a través del cartucho.

El método inicial propuesto consistió en una SPE de la muestra de leche diluida usando cartuchos CarboPrep® 200 (Resteck) cuyo empaquetamiento es de carbono grafitizado no poroso. Los disolventes utilizados se seleccionaron de acuerdo con la bibliografía revisada. Durante todas las etapas de la SPE se utilizó un sistema de vacío que ayuda a que el paso del líquido a través del cartucho sea más uniforme (Visiprep, Supelco). El procedimiento se llevó a cabo como se muestra en la figura IV.A.1 y se detalla a continuación

La muestra de leche (4 mL) diluida en una mezcla de metanol y agua se carga en el cartucho de SPE previamente acondicionado en donde los analitos quedan adsorbidos. Los restos de la muestra que pudieran quedar en el recipiente se arrastran a la jeringa con 2 ml de la mezcla utilizada para diluir la muestra de leche. El cartucho se lava con 2 ml de agua, se seca a vacío durante un minuto y seguidamente se agregan 300 µl de metanol con el objetivo de desplazar el agua residual que pueda quedar, puesto que, si se recoge en el vial, más tarde no podrá ser eliminada.

Las pérdidas debidas a la adición de este pequeño volumen de metanol se han evaluado, observando que no se produce disminución alguna en las señales obtenidas, puesto

que casi la totalidad de esos 300 μ l se quedan en el cartucho y no se eluyen, aunque sí son suficientes como para desplazar el agua residual que queda en el empaquetado de las jeringas.

Finalmente, la elución se produce en dos etapas usando 1,5 mL de MeOH seguido de 6 ml de MeOH:DCM, para abarcar un rango de polaridad similar al de los analitos. Esta fase se repite íntegramente para asegurar la correcta elución de todos los compuestos. Se obtienen así 15 mL de extracto que se evaporan a sequedad para reconstituirlos nuevamente con 1 mL de metanol, de forma que los analitos se encontrarían concentrados en un factor 4 con respecto a la muestra inicial en caso de recuperación cuantitativa. El extracto se analiza directamente en el LC-MS/MS o se congela a -20°C hasta el momento de su análisis.

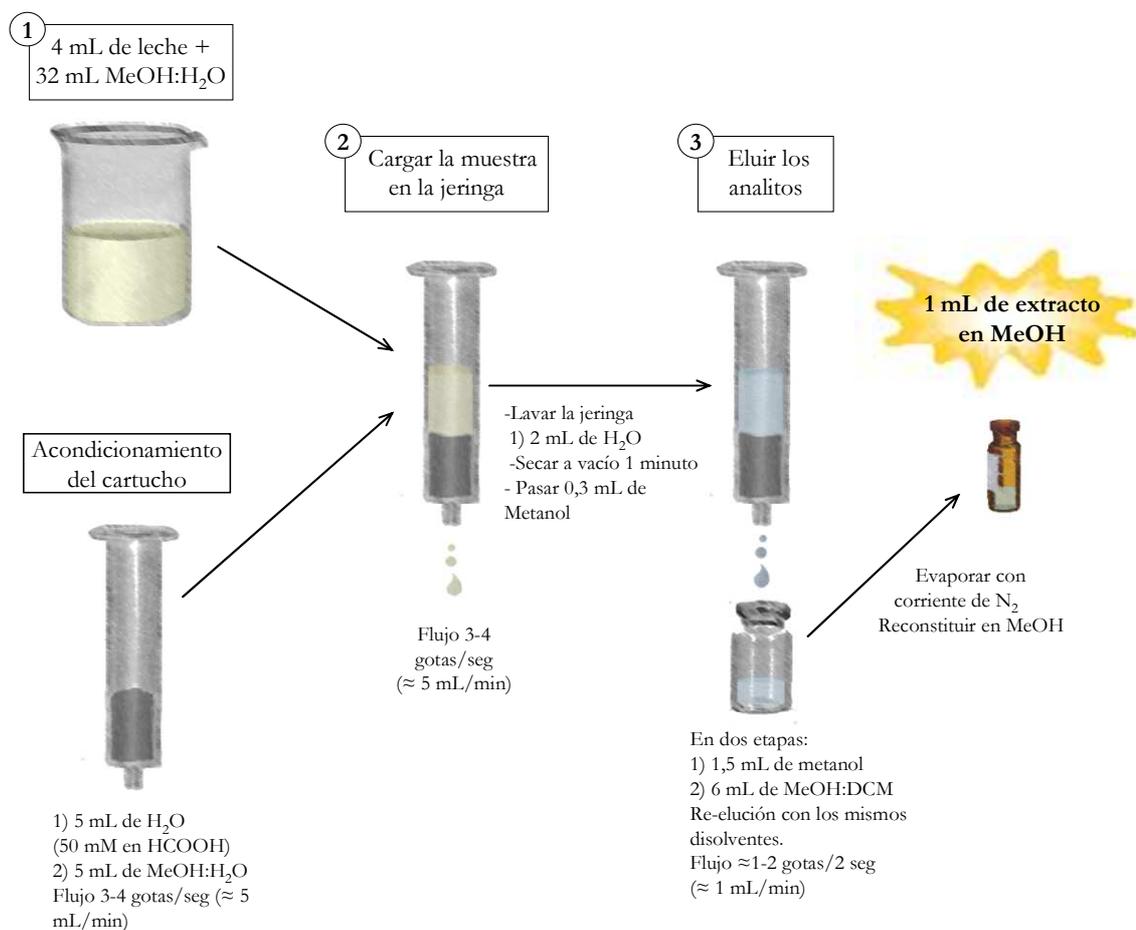


Figura IV.A.1. Procedimiento de extracción de leche por SPE.

1.3.2. QuEChERS.

El método QuEChERS presenta diversas variantes en función de los analitos y matriz a tratar. En este caso, el procedimiento que se ha seguido para extraer los analitos ha sido el siguiente:

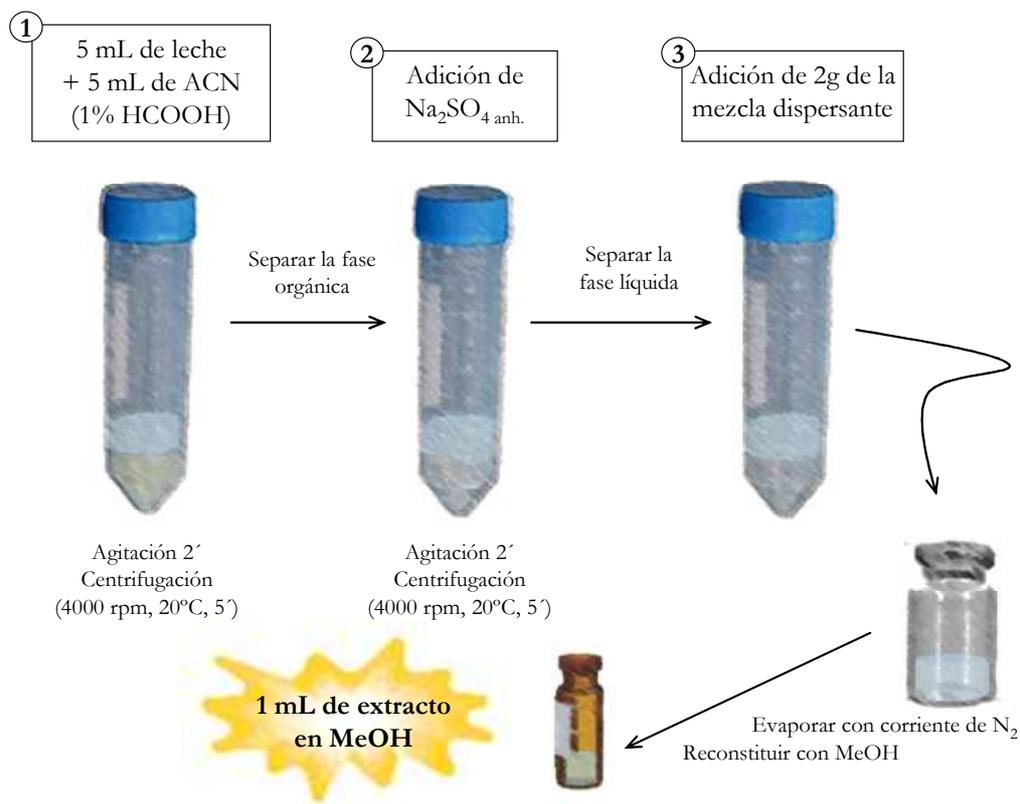


Figura IV.A.2. Procedimiento de extracción de leche por DSPE.

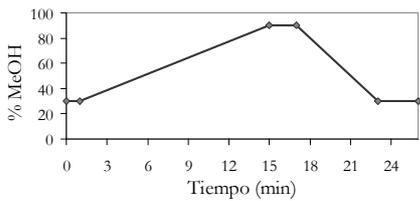
Se toman 5 mililitros de leche cruda conteniendo el subrogado y se diluyen en 5 mililitros de acetonitrilo al 1% en ácido fórmico. La mezcla se agita manual y mecánicamente durante 2 minutos con el resultado de formación de dos fases inmiscibles que se separan, desechando la fase inferior. La porción orgánica se traspasa a otro tubo, se seca con sulfato sódico anhidro, y se añade a continuación la mezcla dispersiva consistente en sulfato de magnesio y superclean PSA mezclados en distinta proporción con un dispersante, en este caso

C₁₈ o GCB (Carbón graficitado comercializado bajo el nombre de Supelclean Envi-Carb). Tras agitar nuevamente durante otros dos minutos, la mezcla se centrifuga, separando la porción líquida que se evapora a sequedad bajo corriente de N₂ y se reconstituye con un mililitro de metanol, obteniendo un extracto que contiene los analitos concentrados en un factor 5 con respecto a la muestra.

1.4. DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN.

En lo relativo a la parte analítica, la detección y cuantificación de los compuestos se realizó con el dispositivo de LC-MS/MS, Quantum Acces de Thermo Fisher Scientific presentado anteriormente. Se utilizó una fuente de ionización HESI, y el modo de adquisición fue SRM (Selected Reaction Monitoring), con ionización positiva y negativa. Se utilizó el método de análisis cuyas condiciones se resumen a continuación.

Tabla IV.A.2. Condiciones cromatográficas empleadas para la detección de los analitos.

COLUMNA			
Symmetry Shield (Waters)	Fase estacionaria	C ₁₈	
	Dimensiones	150×2,1 mm	
	Tamaño de partícula	3,5 µm	
	Tamaño de poro	100 Å	
FASE MÓVIL			
Régimen	Gradiente		
A	Agua tamponada con ácido fórmico al (0,15%) y formiato amónico (3mM)		
B	Metanol “tamponado” con ácido fórmico al (0,15%) y formiato amónico (3mM)		
Flujo	200 µL min ⁻¹		
T ^a	25°C		
Gradiente de fase móvil	Tiempo (min)	% H₂O	% MeOH
	0	70	30
	1	70	30
	15	10	90
	17	10	90
	23	70	30
26	70	30	
			
DETECTOR			
Modo de ionización	Positivo	Negativo	
Voltaje del spray (V)	3800	3000	
T ^a del vaporizador (°C)	200	50	

Modo de ionización	Positivo	Negativo
T ^a del capilar (°C)	350	350
Gas de impulsión (u.a.) ¹	35	35
Gas auxiliar (u.a.)	4	4
Voltaje del <i>skimmer offset</i> (V)	4	4
Tiempo de scan (mseg)	5	20
Cono de barrido de iones (u.a.)	4	0

¹unidades arbitrarias (u.a.)

Se inyectaron 10 µL de los patrones de los compuestos para realizar los calibrados necesarios y 5 µL de los extractos para minimizar los posibles daños en la fuente de ionización.

2. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

2.1. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS.

El equipo de LC-MS/MS utilizado cuenta con un detector de triple cuadrupolo que es suficientemente selectivo por lo que no es necesario optimizar la separación cromatográfica puesto que es capaz de detectar los analitos aunque estén co-eluidos y presenten el mismo ión producto (ausencia de efecto cross talk).

Si bien los aspectos puramente cromatográficos, aquellos que afectan solamente a la separación y la buena resolución de los picos, no han de ser evaluados, los relativos a la detección sí es necesario que se optimicen puesto que de ello dependen las respuestas obtenidas, y en consecuencia la sensibilidad.

Los detectores de MS/MS son dispositivos complejos que dependen de muchos factores que influyen en la respuesta final obtenida, y por lo tanto hay muchos parámetros susceptibles de ser optimizados. De todos ellos, los más importantes a la hora de evaluar la respuesta analítica, son las energías de colisión. Para ello, los pesticidas se introdujeron directamente en la fuente y las energías de colisión de las transiciones MS/MS de cada uno de ellos fueron optimizadas para la determinación y cuantificación de los mismos (primera y segunda transición). La tabla IV.A.3 recoge las transiciones utilizadas.

Tabla IV.A.3. Transiciones SRM y energías de colisión para la detección y cuantificación de los pesticidas estudiados

	Primera transición				Segunda transición		
	T _R	Ionización (+ / -)	Ión precursor (m/z)	Ión producto (m/z)	Energía de colisión (V)	Ión producto (m/z)	Energía de colisión (V)
Acetocloro	14,0	HESI+	256,0	133,0	31	148,0	18
Alacloro	14,1	HESI+	270,0	238,1	10	162,2	22
Atrazina	12,2	HESI+	216,0	174,1	20	104,2	23
Atrazina-D5	12,2	HESI+	220,9	179,1	23	145,0	25
Bentazona	12,9	HESI-	239,1	197,2	19	132,0	30
Bromacil	12,6	HESI+	261,0	205,0	15	172,0	15
Bromoxinil	13,6	HESI-	274,0	167,0	45	79,0	35
Carbetamida	9,8	HESI+	237,0	120,2	13		
Cianazina	10,2	HESI+	241,1	214,1	16	120,1	24
Clorfenvinfos	14,7	HESI+	358,9	205,0	23	170,0	33
Cloridazón	8,0	HESI+	222,0	104,0	22	77,5	26
Cloroxurón	14,5	HESI+	291,1	218,2	22	163,0	20
Clorpirifós	17,1	HESI+	349,9	198,0	17	125,1	15
Clortolurón	12,6	HESI+	213,1	182,1	15	140,2	18
DEA	8,5	HESI+	188,1	146,1	17	104,0	27
DETBA	11,3	HESI+	202,1	146,1	18	104,2	28
DIA	6,4	HESI+	174,1	132,2	14	104,2	22
Diazinón	14,9	HESI+	305,1	169,1	20	153,0	20
Dimefurón	12,5	HESI+	339,1	256,0	17	140,0	30
Dinoterb	16	HESI-	239,1	207,0	29	176,0	46
Diurón	13,4	HESI+	233,0	160,3	20	72,0	16
Etidimurón	7,0	HESI+	265,0	208,1	19	162,1	21
Fipronil	15	HESI-	435,0	330,0	16	317,0	24
Fosalona	15,8	HESI+	367,9	182,0	12	138,0	28
Imidacloprid	6,4	HESI+	256,0	209,0	17	175,0	22
Ioxinil	14,6	HESI-	370,0	215,0	38	127,0	50
Isoproturón	12,1	HESI+	207,2	134,0	22	72,4	13
Linurón	14,3	HESI+	249,1	182,0	20	160,0	16
Malatión	13,5	HESI+	331,0	127,0	14		
Metabenzthiazurón	12,5	HESI+	222,0	165,1	18	150,1	35
Metabromurón	12,6	HESI+	259,0	170,0	24	148,0	16
Metamitrona	7,2	HESI+	203,1	175,1	16	104,0	21
Metazacloro	11,5	HESI+	278,1	210,1	12	134,2	20
Metil pirimifós	15,2	HESI+	306,1	164,1	25	108,0	25
Metolacloro	14,0	HESI+	284,2	176,2	26	134,0	26
Mevinfós	7,6	HESI+	225,0	127,0	13	109,0	32
Monolinurón	12,1	HESI+	215,0	126,2	20	99,0	39

	Primera transición				Segunda transición		
	T _R	Ionización (+ / -)	Ión precursor (m/z)	Ión producto (m/z)	Energía de colisión (V)	Ión producto (m/z)	Energía de colisión (V)
Prometrina	12,2	HESI+	242,0	200,1	19	158,1	23
Propazina	13,4	HESI+	230,0	188,0	17	146,1	22
Quinmerac	7,6	HESI+	222,0	204,0	25	140,0	26
Simazina	10,8	HESI+	202,1	132,2	24	124,0	19
Terbutilazina	13,7	HESI+	230,0	104,0	31	174,1	21
Terbutrina	12,3	HESI+	242,0	186,1	19		
Triadimefón	13,6	HESI+	294,0	197,0	15	141,0	27
Triazofós	14,0	HESI+	314,0	162,1	18	119,1	35

Además, se realiza también un ajuste algo más fino con el que se puede ganar algo de sensibilidad en las respuestas. Por una parte, el equipo analítico realiza ciertas autocomprobaciones que proporcionan los mejores valores para factores dependientes de voltajes o posiciones de lentes, por ejemplo. Otros sin embargo han de ser optimizados por el operario a base de ensayos y comparaciones de respuestas. Los valores de los parámetros seleccionados tras evaluar la variación de respuestas son los que se muestran en la tabla VI.A.2.

2.2. PRUEBAS PREVIAS.

2.2.1. Pruebas con leche fresca semidesnatada comercial.

Los primeros ensayos fueron planteados sobre leche comercial puesto que supone una matriz más sencilla que la leche cruda, ya que está homogeneizada. Los procesos industriales aplicados a la leche comercial implican tratamientos que provocan algunos pequeños cambios físicos y químicos en las grasas y se desnaturalizan algunas proteínas; además durante el proceso UHT se produce la caramelización parcial los azúcares. Por esta razón se seleccionó una leche pasteurizada, comúnmente “leche fresca” (no sufre proceso de UHT) con una carga media de grasa -valores comerciales: 1,6% (g/g)-, para observar el comportamiento de la misma y aplicar la metodología desarrollada con ésta a la leche cruda, matriz mucho más compleja.

2.2.1.1. Diseño experimental

Hay varios factores que pueden influir en la eficacia del método de SPE. La dilución de la muestra afecta a la matriz y su interacción con los analitos por lo que es necesario evaluar el efecto del factor de dilución y de la proporción de disolventes utilizados.

Con este fin se aplicó un diseño experimental de tipo Doehlert considerando como variables la **proporción de metanol en la mezcla MeOH:H₂O utilizada para diluir la muestra** y el **factor de dilución** de la misma. El primero de los factores se estudió a 5 niveles y el segundo a 3, tal y como se muestra en la siguiente tabla:

Tabla IV.A.4. Variables estudiadas con el diseño experimental.

Factores estudiados	Niveles	Valores codificados
Proporción de MeOH:H ₂ O (v/v)	15:85	-1
	30:70	-0,5
	45:55	0
	60:40	0,5
	75:25	1
Factor de dilución	3	-0,866
	9	0
	15	0,866

Se genera un conjunto de experimentos ajustados a la siguiente matriz de experiencias establecida con los valores codificados de los niveles de cada factor.

Tabla IV.A.5. Matriz de experiencias del diseño.

Experiencia	Valores codificados de los niveles de cada factor		Valores reales de los niveles de cada factor	
	Factor MeOH:H ₂ O	Factor dilución	Factor MeOH:H ₂ O	Factor dilución
1	0	0	45:55	9
2	0	0	45:55	9
3	0	0	45:55	9
4	-1	0	15:85	15
5	-0,5	0,866	30:70	15
6	1	0	75:25	9
7	0,5	-0,866	60:40	3

Experiencia	Valores codificados de los niveles de cada factor		Valores reales de los niveles de cada factor	
	Factor MeOH:H ₂ O	Factor dilución	Factor MeOH:H ₂ O	Factor dilución
8	-0,5	-0,866	30:70	3
9	0,5	0,866	60:40	15

Para que los valores obtenidos fueran comparables, el volumen de muestra que se cargó en los cartuchos fue siempre de 36 mL y las muestras se fortificaron de forma que la concentración teórica en el extracto final fuera de 4 ng mL⁻¹ para todos los compuestos analizados. Los valores de recuperación calculados en cada caso se trataron estadísticamente con el programa Statgraphics-Plus, que proporciona un estudio de varianza así como las ecuaciones de segundo grado, dependientes de los factores tratados y sus interacciones, que definen las respuestas obtenidas. Estas ecuaciones proporcionan unas gráficas de superficie de respuesta para cada compuesto, accediendo así la información necesaria para fijar las condiciones experimentales óptimas para cada analito.

Para la mayoría de los compuestos (más de 30) los modelos ajustados fueron significativos al nivel de confianza de 90 o 95%. Del análisis de los resultados del diseño se puede concluir que **el factor de dilución no fue un factor significativo** dentro del dominio explorado para la mayoría de los compuestos. Por esta razón ha decidido fijarse en 9 para posteriores ensayos, puesto que trabajando con diluciones menores se observaron ciertas dificultades a la hora de que la muestra de leche diluida traspasara el empaquetado de la jeringa, viéndose dificultado el proceso de carga de la muestra en el cartucho. Por el contrario, como muestran las superficies de respuesta (figura IV.A.3), **el factor MeOH:H₂O tuvo un efecto significativo** sobre las respuestas obtenidas. En general el comportamiento observado muestra un efecto negativo al exceder la proporción 50:50, estableciéndose el **máximo de respuesta entre 30:70 y 40:60 para la mayor parte de los pesticidas** estudiados, presentando un valor óptimo medio entre los 44 compuestos de 39,7 % de metanol en la mezcla de dilución.

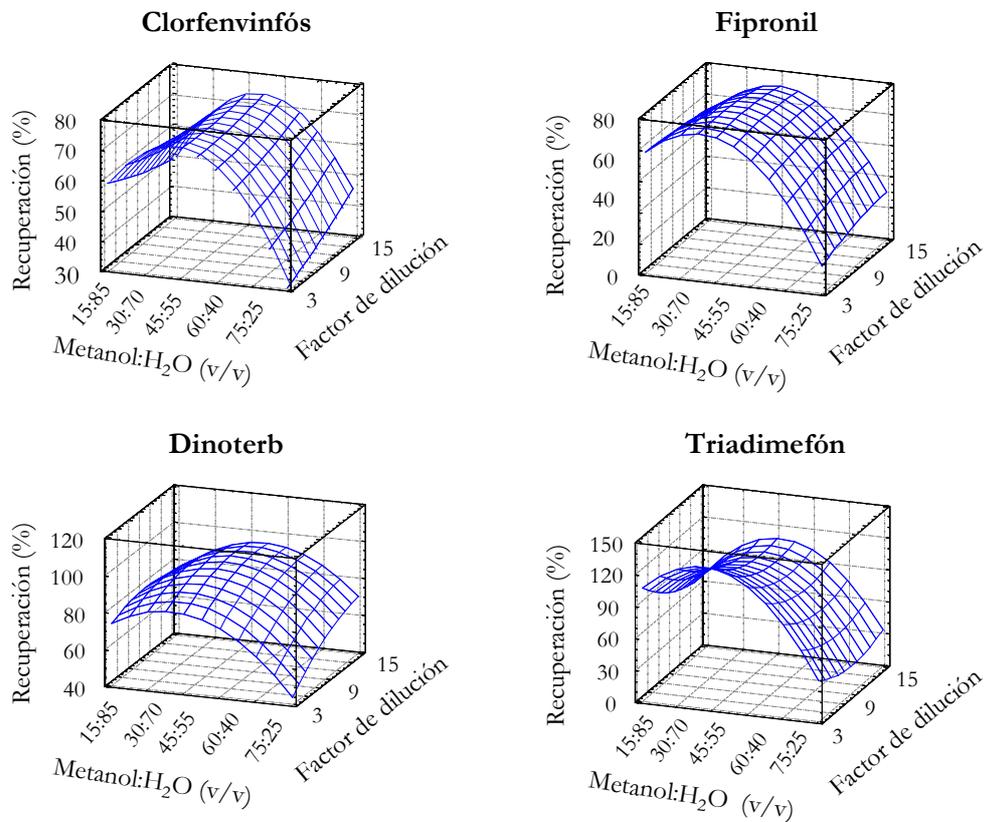


Figura IV.A.3. Superficies de respuesta obtenidas con el diseño experimental de Doehlert

Por otra parte, pruebas realizadas variando la combinación MeOH:DCM utilizada para eluir los compuestos pusieron de manifiesto una clara tendencia al aumento de las respuestas cuando la proporción de DCM en la mezcla de elución era mayor, por lo que se fijaron las siguientes condiciones de compromiso para la SPE de los 44 analitos:

Tabla IV.A.6. Condiciones del proceso de extracción por SPE.

Volumen de leche (mL)	4
Factor de dilución	9
MeOH:H ₂ O (v/v)	40:60
MeOH:DCM (v/v)	10:90

2.2.2. Aplicación del método de SPE a leche cruda.

El método desarrollado para leche comercial semidesnatada se aplicó a muestras de leche cruda cogida directamente en el tanque de frío de la explotación ganadera del CIAM. Las muestras se trataron en el mismo momento del muestreo, por lo que no sufrieron ningún proceso que pudiera influir en la naturaleza de la leche estudiada.

Los análisis de composición de esta matriz, revelan que contiene un 3,7% de grasa, proporción mucho más alta que la leche comercial estudiada. Además hay que tener en cuenta que se trata de una muestra que no ha sido sometida a ningún tipo de tratamiento tras su recogida, por lo que es mucho más heterogénea que la comercial. Debido a esto, al aplicar el proceso de SPE optimizado con el diseño a la leche cruda, **resultó imposible que la muestra diluida traspasara el empaquetado de la jeringa**, incluso aplicando diluciones mayores a la que se estableció como óptima.

Por esta razón se establece la necesidad de emplear otra técnica de preparación de muestra. Se plantea la utilización de la **DSPE**, de tipo **QuEChERS**, como técnica de extracción de los analitos puesto que se trabaja con una matriz con alto contenido en agua y un importante componente lipofílico, cualidades que hacen que esta técnica sea, a priori, efectiva, de acuerdo con los aspectos teóricos de la misma presentados en el capítulo de Introducción.

2.2.3. Desarrollo de la metodología de DSPE (QuEChERS).

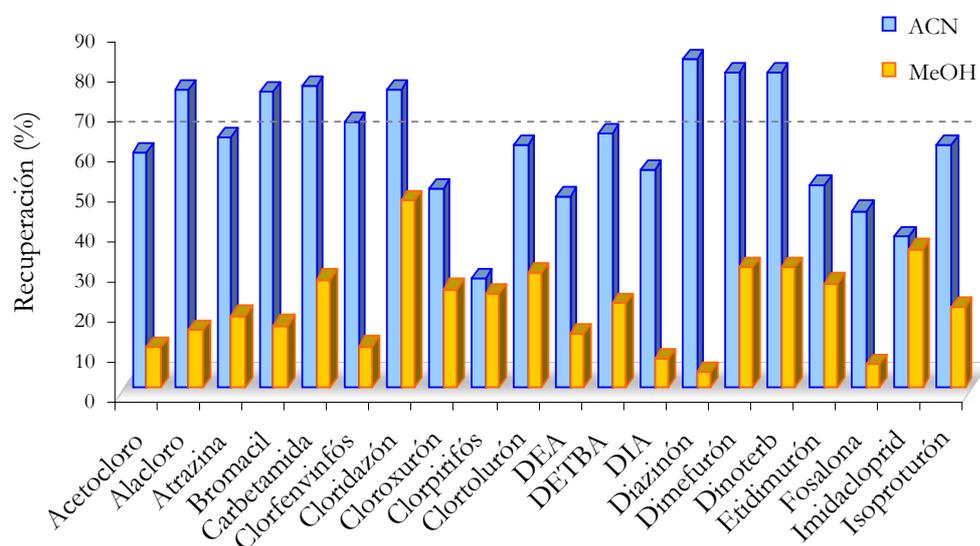
Como ya se ha explicado anteriormente los métodos QuEChERS representan procedimientos muy sencillos y rápidos en los que un extracto de la muestra se pone en contacto con un agente dispersante (Figura IV.A.1). Para el desarrollo de la investigación expuesta en este capítulo se usaron dos mezclas de dispersantes, conteniendo ambas PSA y sulfato de magnesio, combinados en un caso con C_{18} y en otro con GCB según las siguientes proporciones: **C_{18} :PSA:MgSO₄ (1:1:6)** y **GCB:PSA:MgSO₄ (0,1:1:6)**. De ahora en adelante, en lo referente a DSPE, cuando se citen estas mezclas se hará refiriéndose a ellas como *la mezcla de C_{18}* y *la mezcla de GCB*.

El método de QuEChERS desarrollado por *Anastassiades et al.* [29] se lleva a cabo utilizando acetonitrilo (ACN) como disolvente de extracción. Por otra parte, como se ha expuesto anteriormente, en el método de SPE aplicado a leche comercial el metanol resultó efectivo para eluir los analitos. Las polaridades de ambos disolventes son muy parecidas (5,1

para MeOH y 5,6 para ACN) por lo que cabe esperar que extraigan de forma similar a los analitos estudiados, la mayoría de ellos de carácter moderadamente polar.

Se plantea la utilización de estos dos disolventes para aplicar la metodología QuEChERS a la determinación de residuos en muestras de leche, echando mano de la mezcla de C₁₈ y GCB como agentes dispersantes.

Se estudió por una parte, qué disolvente proporcionó mejores respuestas y qué agente dispersante resultó más eficiente para la extracción. Las figuras IV.A.4 y IV.A.5 muestran, respectivamente, las recuperaciones obtenidas al variar el disolvente utilizado, realizando la extracción con la mezcla de C₁₈ y con la mezcla de GCB, calculadas a partir de una muestra fortificada con 4 ng mL⁻¹ de los analitos



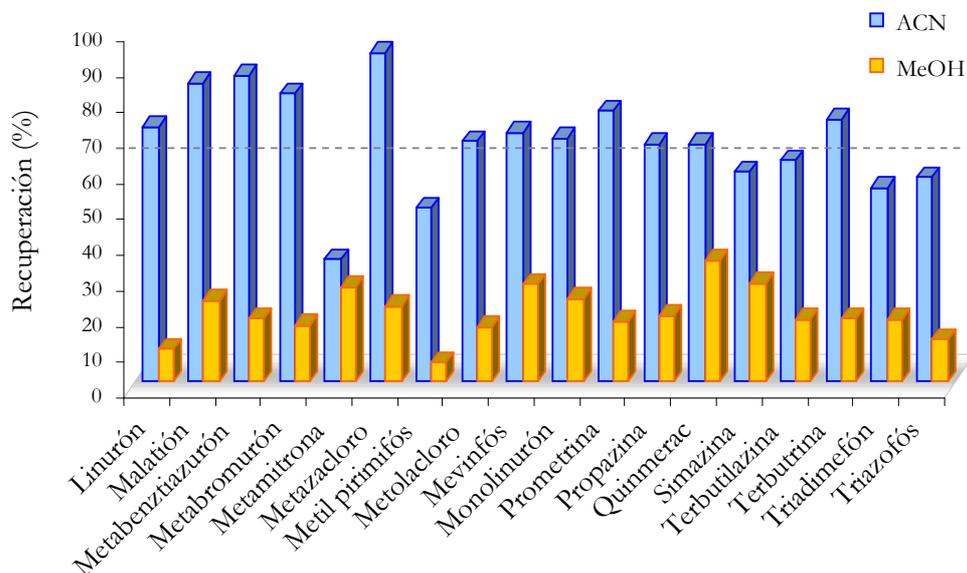
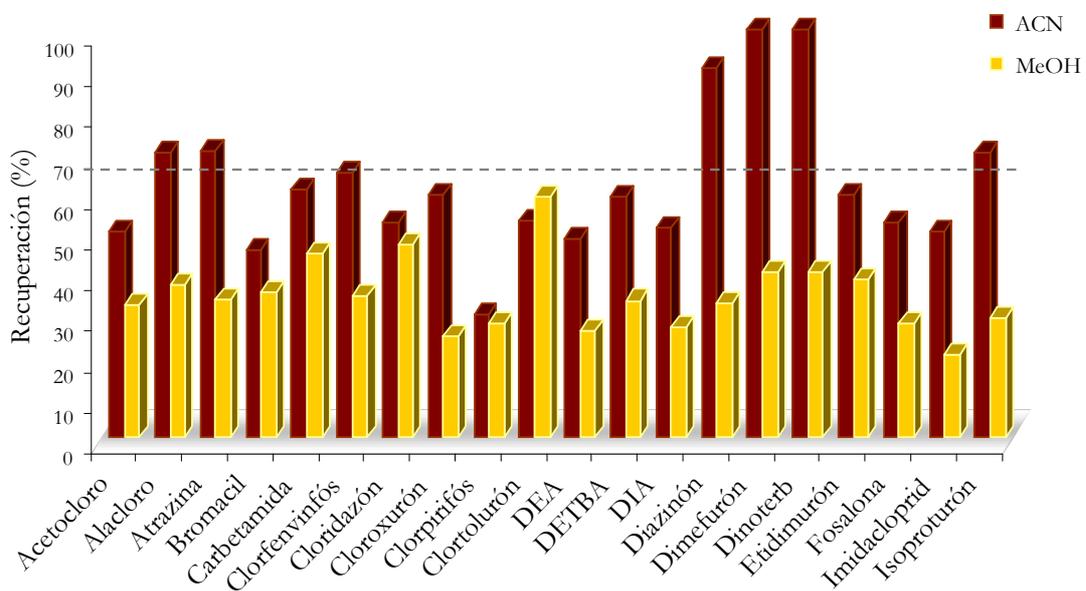


Figura IV.A.4. Recuperación de los compuestos extraídos mediante DSPE con acetonitrilo o metanol utilizando C₁₈ como mezcla dispersante.



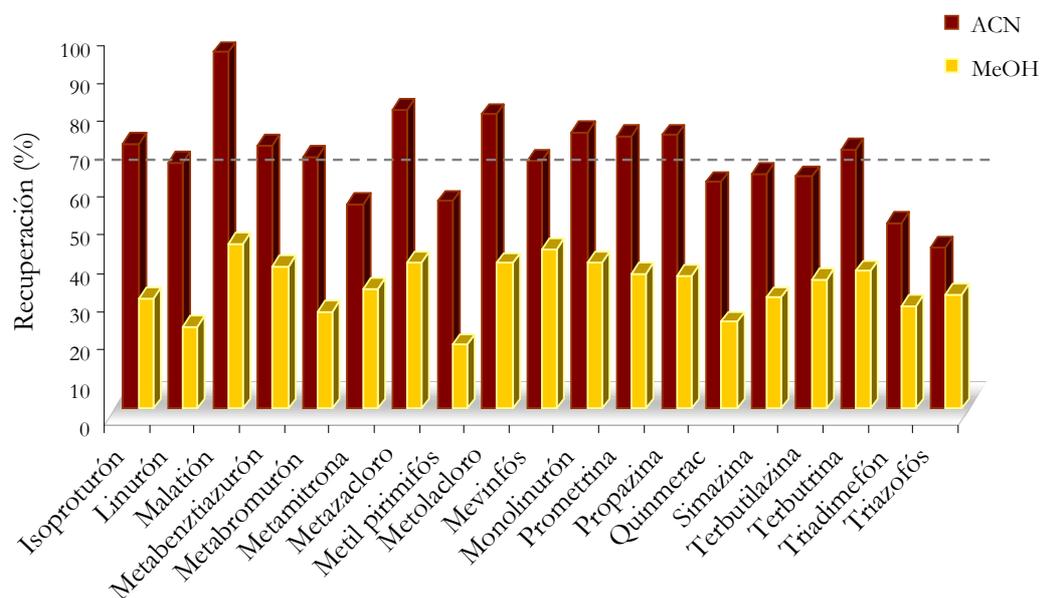


Figura IV.A.5. Recuperación de los compuestos extraídos mediante DSPE con acetonitrilo o metanol utilizando GCB como mezcla dispersante.

Las gráficas ponen de manifiesto que, independientemente del dispersante utilizado, la extracción es más eficiente al trabajar con acetonitrilo frente a metanol para cualquiera de los compuestos estudiados. Se observa también que utilizando metanol, no solamente las recuperaciones son más bajas, sino que en ninguno de los casos las extracciones resultan cuantitativas.

Se selecciona por lo tanto **acetonitrilo como disolvente de extracción**. Seguidamente, se llevó a cabo un estudio por triplicado para evaluar la respuesta obtenida en función del dispersante utilizado.

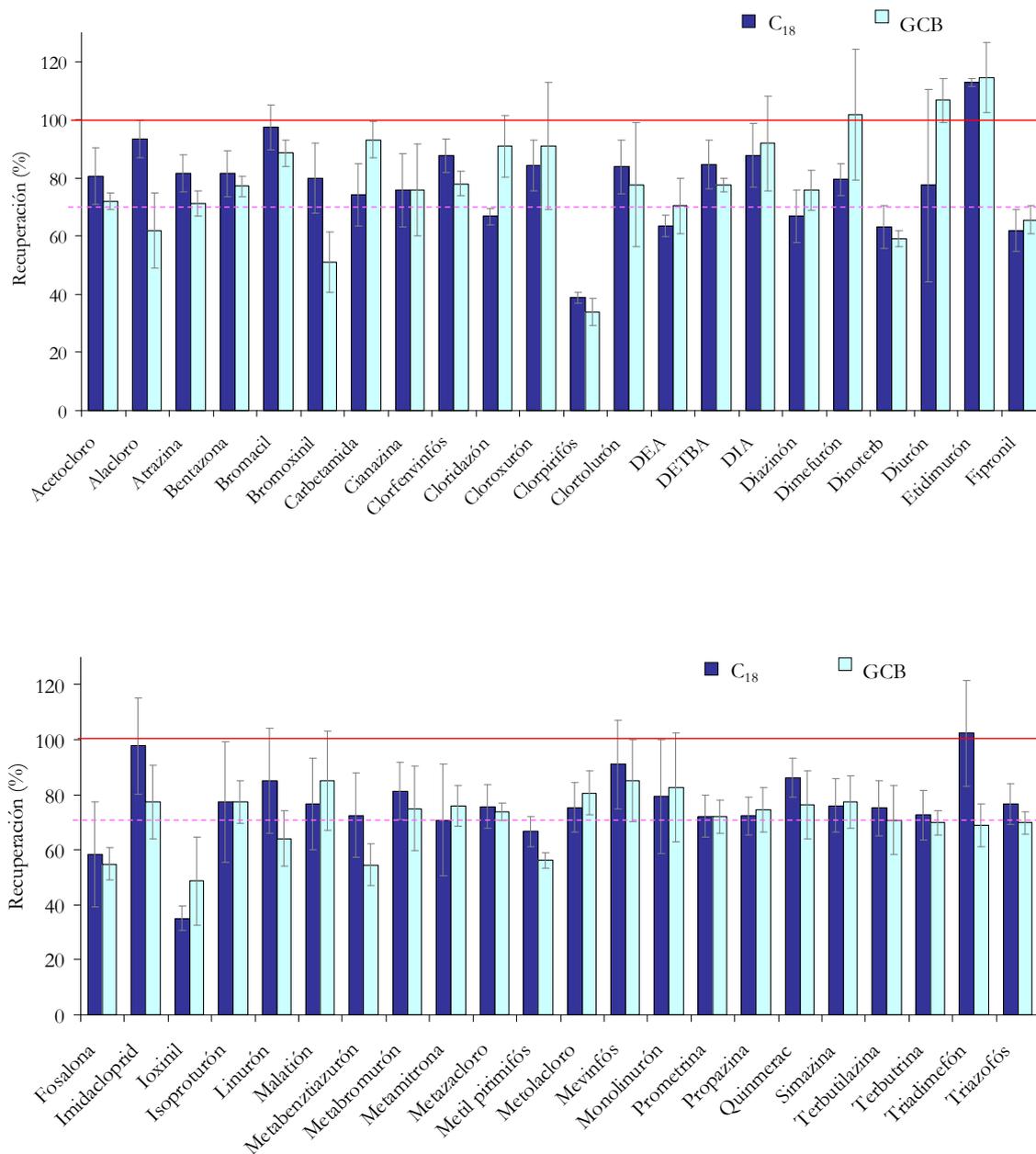


Figura IV.A.6. Gráficas de comparación de las recuperaciones calculadas para extractos de DSPE de leche, realizados con C₁₈ y GCB.

Observando las gráficas obtenidas para el triplicado de una muestra fortificada con 2 ng mL⁻¹ de los analitos, se pone de manifiesto que ambos dispersantes presentan un comportamiento similar. Todos los compuestos a excepción de bromoxinil, ioxinil y clorpirifós, tuvieron valores de recuperación superiores al 50% para ambos dispersantes. Para aquellos analitos en los que la utilización de GCB proporcionó respuestas algo mayores (carbetamida, cloridazón, dimefurón, diurón e ioxinil), las recuperaciones obtenidas con C₁₈ estuvieron cerca del 70%. En cambio, para aquellos casos en que C₁₈ funcionó claramente mejor (alacloro, bromoxinil, imidacloprid o triadimefón, por ejemplo) las recuperaciones obtenidas con GCB fueron inferiores a este valor, observándose en estos casos una diferencia en las respuestas generalmente mayor. Por otra parte, excepto casos puntuales, la variabilidad de las respuestas es menor cuando se trabaja con C₁₈. Por estas razones se selecciona la **mezcla de C₁₈** como el dispersante para realizar las extracciones de los analitos en leche curda.

Quedan por lo tanto fijadas las variables del procedimiento tal y como se muestra a continuación:

Tabla IV.A.7. Condiciones de compromiso para realizar la DSPE de los 44 analitos.

Volumen de leche (mL)	5
Volumen de ACN (mL)	5
Na ₂ SO ₄ (g) ¹	2
Mezcla de C ₁₈ (g)	2
<i>Proporción de los componentes de la mezcla dispersante</i>	
C ₁₈ (g)	1
Superclean PSA (g)	1
MgSO ₄ (g)	6

¹ Si el extracto requiere más sulfato sódico anhidro, se adiciona de 250 en 250 mg hasta que se aprecie que ha sido suficiente.

La figura IV.A.7 ilustra los cromatogramas obtenidos (HESI+ y HESI-) para un extracto de una muestra de leche fortificada a 4 ng mL⁻¹ con la que se llevó a cabo la optimización de las condiciones experimentales de la DSPE.

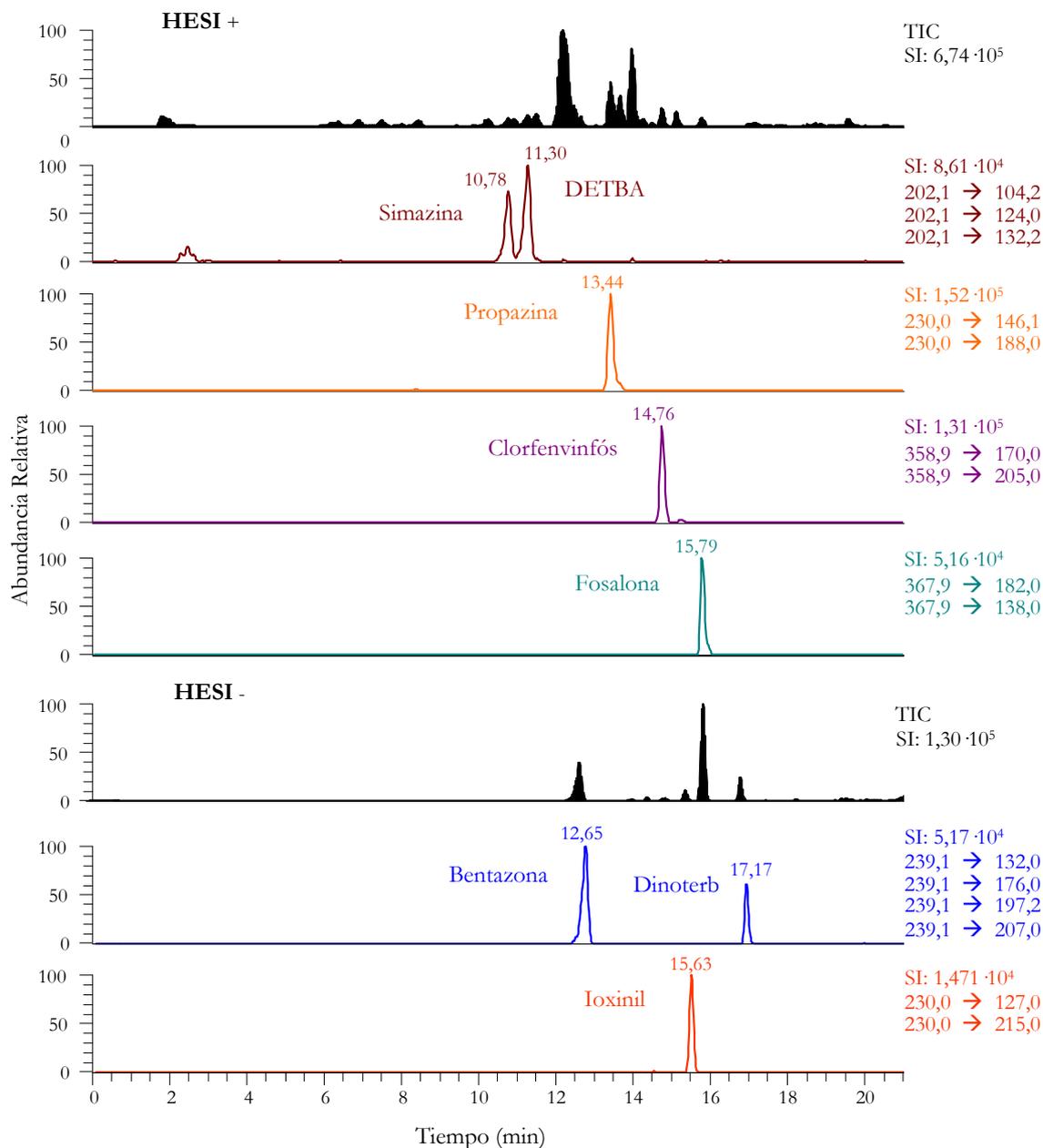


Figura IV.A.7. Cromatogramas obtenidos tras el análisis con el LC-MS/MS de 5 μ l de un extracto de leche cruda preparado con la metodología propuesta.

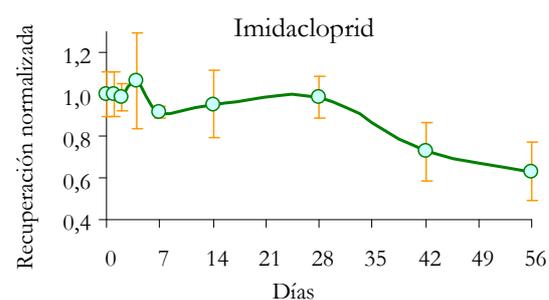
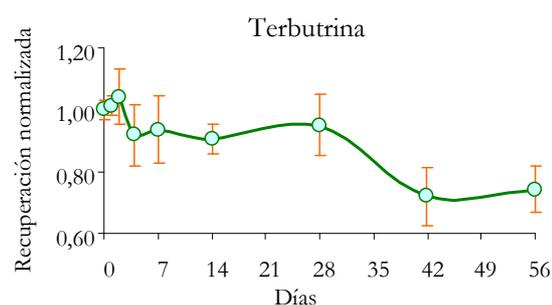
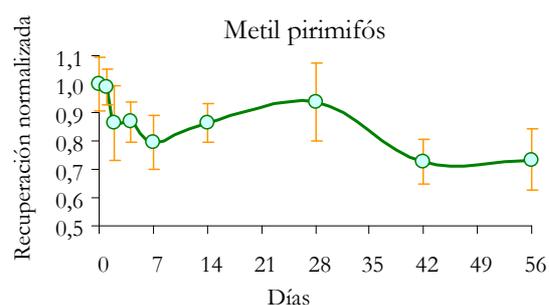
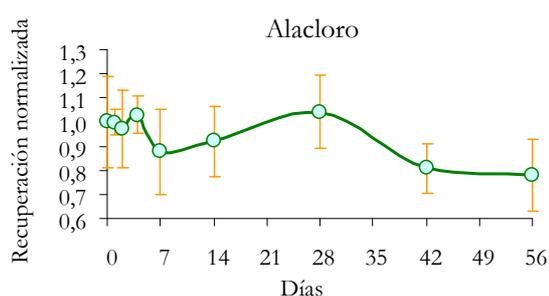
2.2.4. Efecto de congelación de las muestras.

Tabla IV.A.8 Intervalos de tiempo de congelación.

Tiempo de congelación	
	Días
1 día	1
2 días	2
4 días	3
1 semana	7
2 semanas	14
4 semanas	28
6 semanas	42
8 semanas	56

Dado que los muestreos de las explotaciones se realizaron durante la puesta a punto del método y siendo la leche una muestra perecedera, se mantuvieron congeladas las muestras por un período **no superior a un mes** antes de su análisis. Es interesante tener una idea de cómo puede afectar el almacenamiento de las muestras sobre la pérdida de analitos puesto que muchos de ellos se degradan relativamente rápido.

Con este objetivo se programaron una serie de experimentos consistentes en aplicar la metodología desarrollada a triplicados de alícuotas de una misma muestra de leche. Para ello, se tomó una muestra de leche cruda de la explotación del CIAM y se fortificó con $2,5 \text{ ng mL}^{-1}$ de todos los analitos que se almacenaron en el congelador en un rango desde un día hasta dos meses.



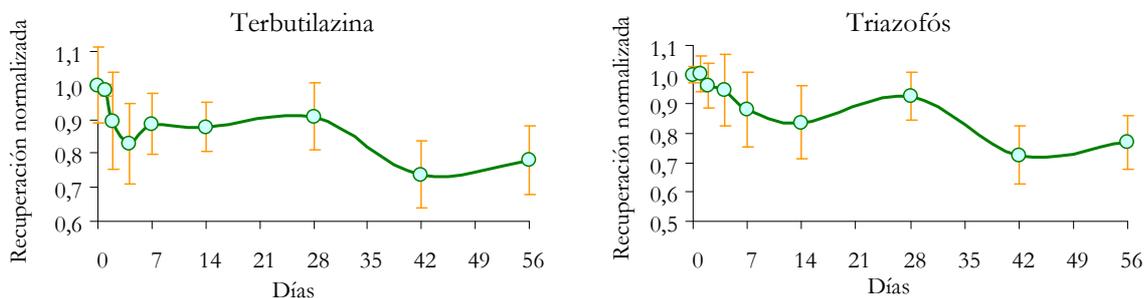


Figura IV.A.8. Efecto de la congelación sobre la señal para 6 de los compuestos estudiados

Este estudio mostró que el almacenaje de las muestras en el congelador a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ no provoca apenas pérdidas de los analitos durante el primer mes, si bien a partir de este momento se observó una clara tendencia en la disminución de la señal.

Este comportamiento se muestra en las gráficas de la figura IV.A.8 en donde se pone de manifiesto el descenso de la señal observada en ciertos pesticidas con el paso del tiempo. Se deduce que a partir del primer mes de almacenaje de las muestras en el congelador los analitos empiezan a degradarse en una medida importante, puesto que en muchos casos, el porcentaje de pérdidas de señal rozó el 60%. Aún así, la estabilidad de los analitos durante el primer mes puede considerarse como buena puesto que para la gran mayoría no se generan pérdidas superiores al 10%, por lo que se puede asumir que en período de análisis de las muestras reales, no se ha producido ningún tipo de disminución de señal debido al almacenaje.

2.2.5. Evaluación del efecto matriz.

El efecto de supresión o aumento de iones en la fuente de ionización por interferencias con la matriz, se estudió por comparación entre las rectas de regresión obtenidas con un calibrado en externo de los compuestos llevado a cabo con los patrones diluidos en metanol, y otro calibrado realizado bajo el método de “*matrix-matched standard*” (calibrados preparados con extractos blancos de matriz) con una presencia de un 40% de matriz en cada uno de los niveles.

Las pendientes que presentan las rectas proporcionadas por el calibrado externo son normalmente mayores que las obtenidas con la calibración por adición de matriz, si bien la

mayoría de los compuestos no presentan una supresión mayor al 25%. Por otra parte, únicamente clorfenvinfós, ioxinil, dinoterb y malatión muestran un efecto de aumento de señal que resultó, en cualquiera de los casos, inferior al 15%

Tabla IV.A.9. Estimación del % de supresión (-) o aumento (+) de señal en LC-MS/MS.

Compuesto	%	Compuesto	%	Compuesto	%
Acetocloro	-23,0	DIA	-42,6	Metamitrona	-17,4
Alacloro	-3,5	Diazinón	-12,6	Metazacloro	-23,4
Atrazina	-25,2	Dimefurón	-19,8	Metil pirimifós	-14,3
Bentazona	-3,2	Dinoterb	14,0	Metolacloro	-11,9
Bromacil	-14,3	Diurón	-18,9	Mevinfós	-3,5
Bromoxinil	-0,5	Etidimurón	-22,4	Monolinurón	-11,6
Carbetamida	-33,8	Fipronil	-25,6	Prometrina	-19,8
Cianazina	-13,9	Fosalona	-22,3	Propazina	-19,4
Clorfenvinfós	2,5	Imidacloprid	-6,1	Quinmerac	-17,2
Cloridazón	-13,7	Ioxinil	12,6	Simazina	-12,9
Cloroxurón	-4,6	Isoproturón	-19,7	Terbutilazina	-19,1
Clorpirifós	-8,1	Linurón	-20,2	Terbutrina	-13,0
Clortolurón	-17,1	Malatión	13,6	Triadimefón	-9,1
DEA	-12,7	Metabenztiaturón	-18,4	Triazofós	-13,0
DETBA	-21,1	Metabromurón	-10,8		

Se asumió la existencia de efecto matriz para alguno de los compuestos estudiados. Con el objetivo de disminuirlo en la medida de lo posible, se decidió realizar las determinaciones en presencia de patrón interno utilizando isoproturón-D6 a tal efecto. Las pruebas efectuadas no proporcionaron los resultados esperados en cuanto a la corrección del efecto de matriz, por lo que, dado que los valores presentados en la tabla IV.A.9 se encuentran dentro de los límites de precisión del método (que se presentan en los apartados posteriores) se decidió mantener la calibración externa para las experimentaciones sucesivas, aun siendo consciente de que el método podría mejorarse en algún caso introduciendo un patrón interno para corregir alguno de los compuestos.

2.3. PARÁMETROS DE CALIDAD DEL MÉTODO

La validación del método propuesto se ha realizado evaluando parámetros analíticos como linealidad, precisión, límites de detección y cuantificación, repetibilidad y reproducibilidad. Todos ellos excepto la linealidad se han calculado a partir de muestras de leche cruda fortificada a dos niveles de concentración: 2 y 4 ng mL⁻¹ para cada uno de los compuestos investigados.

2.3.1. Linealidad.

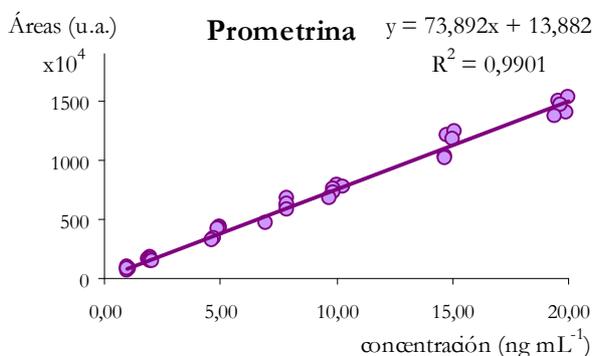


Figura IV.A.9. Recta de calibrado de la prometrina

resultados satisfactorios de forma que se puede afirmar que los 44 compuestos estudiados se ajustan al modelo lineal.

Se ha considerado el estudio de linealidad de la calibración externa en un rango de 1 a 20 ng mL⁻¹ para todos los compuestos estudiados, mediante la evaluación de 5 rectas de calibrado independientes con 7 niveles de concentración. A partir de los datos obtenidos se ha procedido al análisis estadístico mediante la aplicación del test F de Fisher y el test Q de Cochran a un nivel de confianza $\alpha=1\%$ para evaluar respectivamente la linealidad del modelo y la homogeneidad de las varianzas. Ambos test han proporcionado

2.3.2. Exactitud y precisión.

La estimación relativa a la **exactitud** del método se realizó a partir de un triplicado ($n=3$) de una muestra de leche fortificada, realizando el estudio a dos niveles de concentración (2 y 4 ng mL⁻¹). El cálculo de las recuperaciones permite evaluar la exactitud del método, y de la desviación estándar asociada a las medidas (SD) se puede extraer una idea acerca de la precisión en las determinaciones.

Tabla IV.A.10. Precisión y exactitud del método analítico propuesto.

	Recuperación (2 ng mL ⁻¹)		Recuperación (4 ng mL ⁻¹)		Reproducibilidad (2 ng mL ⁻¹)	Repetibilidad (2 ng mL ⁻¹)
	%	SD (n=3)	%	SD (n=3)	RSD (%) (n=5)	RSD (%) (n=5)
Acetocloro	80,5	9,7	66,0	2,4	18,6	11,0
Alacloro	93,4	7,0	81,3	7,1	13,8	11,2
Atrazina	81,6	6,5	66,0	3,2	11,2	6,3
Bentazona	81,6	7,9	67,8	7,9	11,8	4,9
Bromacil	97,5	7,7	71,7	7,0	18,0	8,6
Bromoxinil	79,9	12,2	47,0	6,7	16,9	8,0
Carbetamida	74,3	10,7	84,9	10,6	10,9	16,9
Cianazina	75,8	12,6	75,2	13,0	11,1	13,4
Clorfenvinfós	87,8	5,7	77,3	6,7	11,9	7,4
Cloridazón	66,8	2,9	68,8	1,0	12,8	20,4
Cloroxurón	84,3	8,7	54,4	2,9	22,6	4,0
Clorpirifós	38,8	1,7	30,9	11,7	21,3	19,7
Clortolurón	83,9	9,3	62,8	4,9	11,9	7,6
DEA	63,5	3,8	60,0	7,4	13,4	9,3
DETBA	84,7	8,3	66,0	4,2	20,7	16,9
DIA	87,8	10,9	70,8	7,4	17,1	17,0
Diazinón	66,8	9,1	69,5	2,6	14,6	9,7
Dimefurón	79,5	5,5	90,0	13,0	21,7	9,5
Dinoterb	63,2	7,5	60,4	5,8	19,0	5,2
Diurón	77,5	33,1	60,3	25,3	13,1	6,8
Etidimurón	112,9	1,4	101,6	4,7	23,1	11,4
Fipronil	61,9	7,3	55,3	3,6	11,7	5,1
Fosalona	58,2	19,1	55,3	2,7	11,7	8,5
Imidacloprid	97,7	17,4	90,6	5,7	18,9	16,7
Ioxinil	35,1	4,3	43,1	3,9	12,8	6,3
Isoproturón	77,2	21,9	61,6	3,5	11,6	7,0
Linurón	85,1	19,0	88,1	15,3	15,9	10,5
Malatión	76,7	16,6	68,6	5,3	18,7	9,9
Metabenzthiazurón	72,5	15,3	70,0	1,7	10,3	4,3
Metabromurón	81,4	10,4	76,2	2,3	20,7	8,7
Metamitrona	70,8	20,2	59,7	7,6	12,3	8,2
Metazacloro	75,7	7,9	69,5	3,8	15,9	14,6

	Recuperación (2 ng mL ⁻¹)		Recuperación (4 ng mL ⁻¹)		Reproducibilidad (2 ng mL ⁻¹)	Repetibilidad (2 ng mL ⁻¹)
	%	SD (n=3)	%	SD (n=3)	RSD (%) (n=5)	RSD (%) (n=5)
Metil pirimifós	66,7	5,5	56,3	4,0	9,7	6,9
Metolaclo	75,4	9,1	68,0	5,6	12,4	7,6
Mevinfós	91,0	16,0	73,5	12,4	22,6	18,4
Monolinurón	66,5	13,0	70,6	8,6	12,7	8,6
Prometrina	72,2	7,6	64,6	1,5	11,7	5,0
Propazina	72,4	6,9	65,6	2,0	7,7	5,6
Quinmerac	86,2	7,1	87,6	9,9	6,8	17,9
Simazina	76,1	9,7	80,6	3,6	11,9	5,5
Terbutilazina	75,1	10,0	66,9	1,7	8,8	8,1
Terbutrina	72,6	8,9	61,5	1,3	8,0	7,0
Triadimefón	102,3	19,3	59,8	8,5	13,5	5,9
Triazofós	76,5	7,4	66,0	2,5	8,6	3,8

Los valores de recuperación obtenidos, expuestos en la tabla IV.A.10 fueron satisfactorios. Para el nivel bajo de fortificación **la extracción fue cuantitativa para 34 de los compuestos analizados** (valores de recuperación superiores a 70%). Solamente para dos de los pesticidas estudiados (clorpirifós e ioxinil) el método parece no ser muy exacto.

En cuanto a la recuperación para el nivel alto de fortificación (4 ng mL⁻¹), fueron 17 los compuestos que mostraron recuperaciones cuantitativas. Para el resto las recuperaciones rondaron el 70% a excepción de 3 compuestos (al igual que para el nivel bajo, clorpirifós e ioxinil, y también en este caso bromoxinil).

Teniendo en cuenta que se está evaluando un método multirresiduo, a tenor de los valores expuestos, puede decirse que resultó suficientemente exacto para la gran mayoría de los analitos objeto de estudio.

2.3.3. Repetibilidad y reproducibilidad.

Para hacer una evaluación completa de la precisión del método, un extracto fortificado con 2 ng mL⁻¹ de cada uno de los compuestos fue analizado 5 veces en el mismo día (precisión intra-día o repetibilidad) y cada día durante una semana (precisión inter-día o reproducibilidad).

Como se puede observar en los datos expuestos en la tabla IV.A.10, para la mayor parte de los pesticidas estudiados los valores de **repetibilidad** fueron inferiores a 15%. Solamente 7 compuestos muestran valores comprendidos entre 15 y 20%, frente a una treintena para los cuales la RSD calculada fue menor de 10%. En cuanto a la **reproducibilidad**, los valores son algo más altos, aunque están casi en su totalidad por debajo del 20% de RSD (a excepción de 6 compuestos, si bien en ningún caso se superó el 25% de desviación estándar relativa), mostrando un comportamiento robusto para el método de DSPE propuesto.

2.3.4. LODs y LOQs.

El siguiente paso en la evaluación de la calidad del procedimiento desarrollado es el estudio de los límites de detección y cuantificación, que aportan una idea acerca de la sensibilidad del método. Existen diversos modos de calcular estos valores, si bien el que más se emplea es la extrapolación de la relación entre la señal y el ruido (s/n) de los picos de los cromatogramas: el LOD suele representar la concentración de analito que proporcionaría una relación señal/ruido de 3, mientras que para el LOQ se establece una relación señal/ruido de 10.

Los cromatogramas obtenidos con el detector de MS/MS de triple cuadrupolo muchas veces presentan muy poco ruido y la extrapolación de la relación $s/n = 3$ proporciona unos valores de concentración teórica tan bajos que carecen de todo rigor científico. Otras veces incluso no se llega a cuantificar ruido alrededor del pico cromatográfico, de forma que no puede establecerse valor alguno para los LODs y LOQs. En estos casos las muestras se diluyeron 5 o 10 veces, para poder realizar un cálculo más veraz.

Teniendo en cuenta estas circunstancias, los límites de detección y cuantificación se estimaron considerando extractos o diluciones de los mismos que generaron picos cromatográficos con una $s/n < 200$, a partir de los cuales se realizó una extrapolación, calculando los valores que están expuestos en la tabla IV.A.11., en donde se presentan referidos a muestra líquida y también a residuo seco, para facilitar la comparación con los LMRs dispuestos para alguno de los analitos.

Tabla IV.A.11. Límites de detección y cuantificación en muestra y residuo seco “no graso” de leche.

	LOD (ng L ⁻¹)	LOQ (ng L ⁻¹)	LOD^a (ng g ⁻¹)	LOQ^a (ng g ⁻¹)	LMR (ng g ⁻¹)
Acetocloro	45	151	0,4	1,3	10
Alacloro	54	180	0,4	2,1	10
Atrazina	6,4	21	0,05	0,2	
Bentazona	15	49	0,1	0,4	20 ^b
Bromacil	106	354	0,9	2,3	
Bromoxinil	41	138	0,3	1,2	10 ^b
Carbetamida	71	236	0,6	2	50
Cianazina	60	199	0,5	2,2	
Clorfenvinfós	61	202	0,5	1,7	10
Cloridazón	70	233	0,6	2	100
Cloroxurón	55	184	0,5	1,5	50
Clorpirifós	78	258	0,6	2,2	10
Clortolurón	86	287	0,7	2,4	50
DEA	68	227	0,6	2,8	
DETBA	58	192	0,5	1,6	
DIA	54	181	0,5	1,5	
Diazinón	20	66	0,2	0,6	10
Dimefurón	34	113	0,3	0,9	
Dinoterb	16	53	0,1	0,4	50
Diurón	199	663	1,7	5,6	50 ^b
Etidimurón	47	157	0,4	1,3	
Fipronil	9,7	32	0,08	0,3	5 ^b
Fosalona	87	289	0,7	2,4	
Imidacloprid	60	199	0,5	1,7	50
Ioxinil	86	285	0,7	2,4	10 ^b
Isoproturón	97	325	0,8	2,7	50
Linurón	143	477	1,2	1,9	
Malatión	42	141	0,4	1,2	20 ^b
Metabenzthiazurón	360	1200	3	10,1	50
Metabromurón	75	249	0,6	2,1	
Metamitrona	90	301	0,8	2,5	50
Metazaclo	78	259	0,6	2,2	50
Metil pirimifós	7,5	25	0,06	0,2	50
Metolacloro	112	373	0,9	3,1	50

	LOD (ng L ⁻¹)	LOQ (ng L ⁻¹)	LOD^a (ng g ⁻¹)	LOQ^a (ng g ⁻¹)	LMR (ng g ⁻¹)
Mevinfós	214	713	1,8	6	
Monolinurón	101	336	0,8	2,8	50
Prometrina	6,5	22	0,05	0,2	
Propazina	6,4	21	0,05	0,2	
Quinmerac	46	154	0,4	1,3	50
Simazina	17	55	0,1	0,5	50
Terbutilazina	11	35	0,1	0,3	50
Terbutrina	25	82	0,2	0,7	
Triadimefón	18	61	0,1	0,5	100 ^b
Triazofós	20	68	0,2	0,6	10

^a Valores estimados para residuo seco; densidad de la leche cruda: 1,032; materia seca en la leche cruda: 8,5%; contenido en grasa 3,7%

^b LMR fijado para la suma de compuesto y metabolito.

Todos los valores de **LOQ** propuestos en residuo seco se encuentran **al nivel de la baja parte por billón**, con valores por debajo de 10,1 ng g⁻¹, llegando incluso a ser inferior a 1 ppb (ng g⁻¹) para 12 de los compuestos estudiados, cumpliendo en cualquiera de los casos con las especificaciones en cuanto a niveles máximos de residuos especificados por la Unión Europea.

2.4. APLICACIÓN AL ESTUDIO DE MUESTRAS RECOGIDAS EN EXPLOTACIONES GALLEGAS.

EL método QuEChERS propuesto de DSPE con acetonitrilo y C₁₈ se aplicó sobre **muestras de leche cruda recogidas en 35 granjas gallegas**, las cuales fueron almacenadas a -20°C (nunca más de un mes en congelador) y descongeladas un día antes de proceder a su extracción. No se ha llevado a cabo ningún pretratamiento especial para estas muestras, a parte de la homogeneización manual del contenido de la botella y la fortificación con atrazina-D₅ como subrogado a un nivel de 4 ng mL⁻¹ para seguir la eficacia de la extracción.

El análisis por LC-MS/MS reveló **que no se detectaron residuos** de ninguno de los pesticidas estudiados en ninguna de las 35 muestras analizadas, para las cuales, la atrazina-D₅ proporcionó unos valores de recuperación medios de 77,5% (RSD de 8,5%)

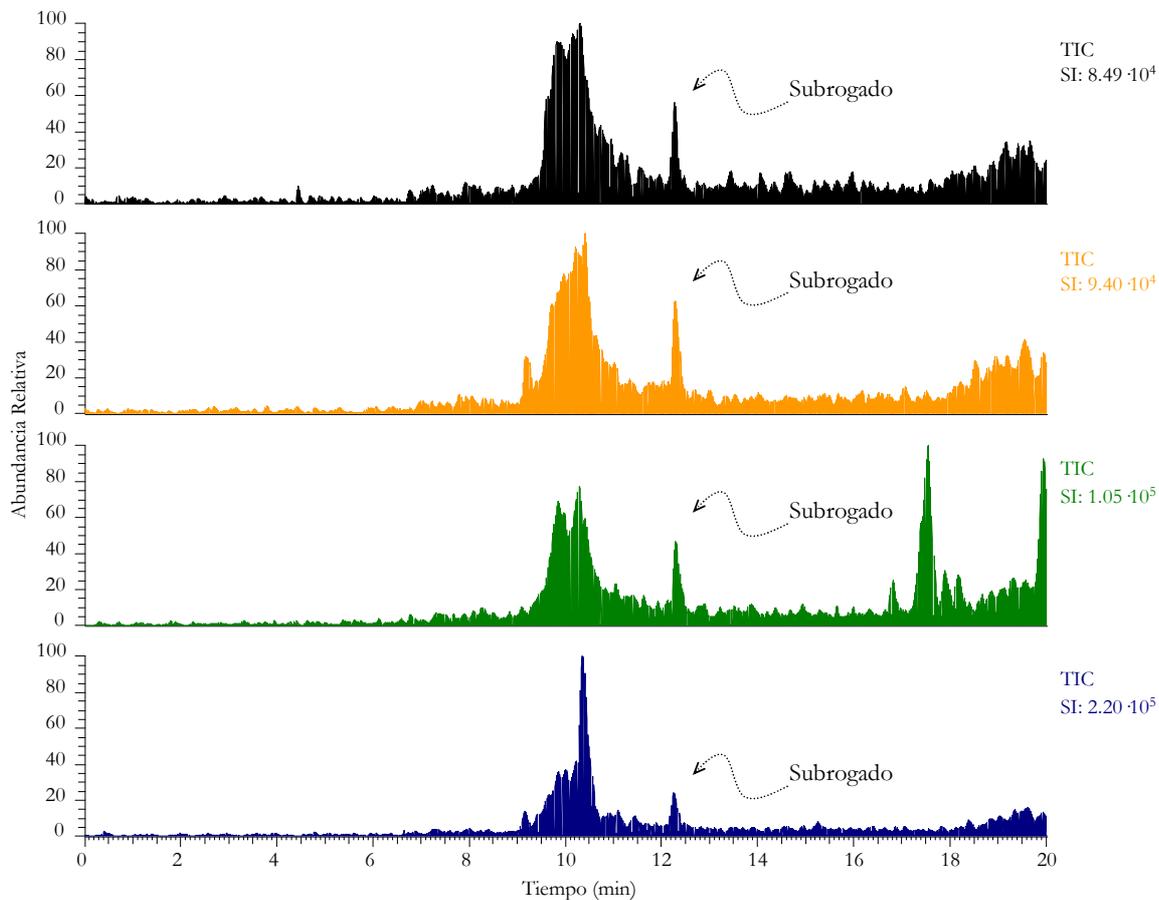


Figura IV.A.9 Cromatograma obtenido para 4 de las muestras de leche analizadas.

Las mismas muestras de leche fueron analizadas en el Instituto de Investigaciones y Análisis Alimentarios (IIAA), centrándose el estudio en la determinación de residuos de piretroides y organoclorados. Según los resultados publicados por *Fernández-Álvarez et al.* [6] no se detectaron residuos de ninguno de los compuestos estudiados a no ser trazas de clordano en una de las muestras analizadas.

2.5. EVALUACIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN DE PESTICIDAS EN LA LECHE.

La leche es una matriz heterogénea formada en su mayor parte por agua (alrededor de un 85-90%), siendo el resto proteínas, azúcares, grasas y en menor medida sales minerales. Dado que los pesticidas analizados son mayoritariamente lipofílicos, cabe esperar que se encuentren distribuidos entre ambas fracciones, presentándose los más apolares fuertemente retenidos en la fracción grasa de la leche. Como una aplicación adicional del procedimiento expuesto en este apartado, se llevó a cabo un estudio paralelo con el propósito de evaluar cómo se distribuyen los compuestos estudiados en las principales fracciones de la leche de vaca.

2.5.1 Procedimiento experimental.

2.5.1.1 Pretratamiento de muestra.

El primer paso en el desarrollo de esta investigación fue **separar de una forma efectiva las fracciones constituyentes de la leche**. Para ello se aplicó centrifugación a una muestra de leche cruda recién cogida del tanque de frío, y como resultado se formaron dos fracciones, una líquida constituida por la **fase acuosa** conteniendo la mayor parte de los constituyentes (de acuerdo con la composición de los sueros: proteínas, azúcares y sales), y **otra sólida** mayormente formada por la grasa de la muestra, que a partir de ahora se denominará **“nata”**.

Se centrifugaron 250 mL de leche en alícuotas de 50 mL y la fracción de grasa se recogió en un vaso de precipitados en donde se dejó “escurrir” para eliminar todos los restos de sueros o fracción líquida posible. Se obtuvieron de esta forma cerca de 10 gramos de nata. Por otra parte, las 5 alícuotas del resto de leche que constituyó la fracción acuosa se juntaron y homogeneizaron por agitación.

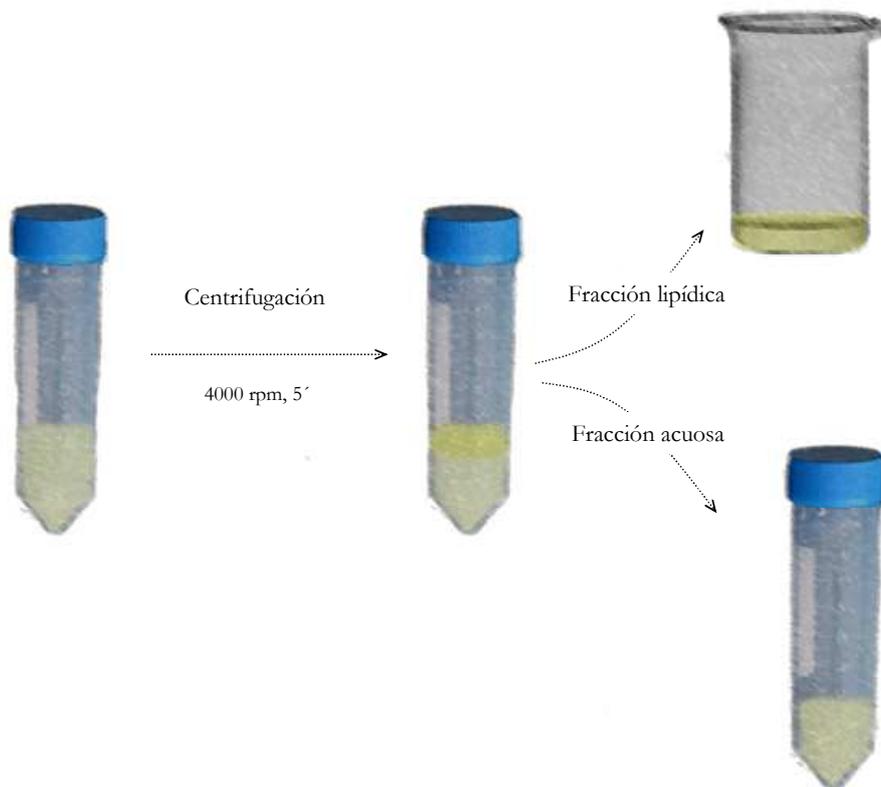


Figura IV.A.10. Separación de una muestra de leche cruda en dos fases.

2.5.1.2 Fortificación de las muestras.

Si bien para el estudio de distribución de los pesticidas se fortificó una muestra de leche cruda recién cogida del tanque de frío, para la evaluación de las recuperaciones la fortificación se realizó a cada una de las partes previamente separadas y aisladas.

Ambas fracciones se fortificaron con una solución metanólica de los compuestos a $1 \mu\text{g mL}^{-1}$. En el caso de la **nata** se fortificó la totalidad de la fracción aislada para lograr una **concentración final de 5 ng g^{-1} en la muestra**. Esta se agitó de forma mecánica por un plazo

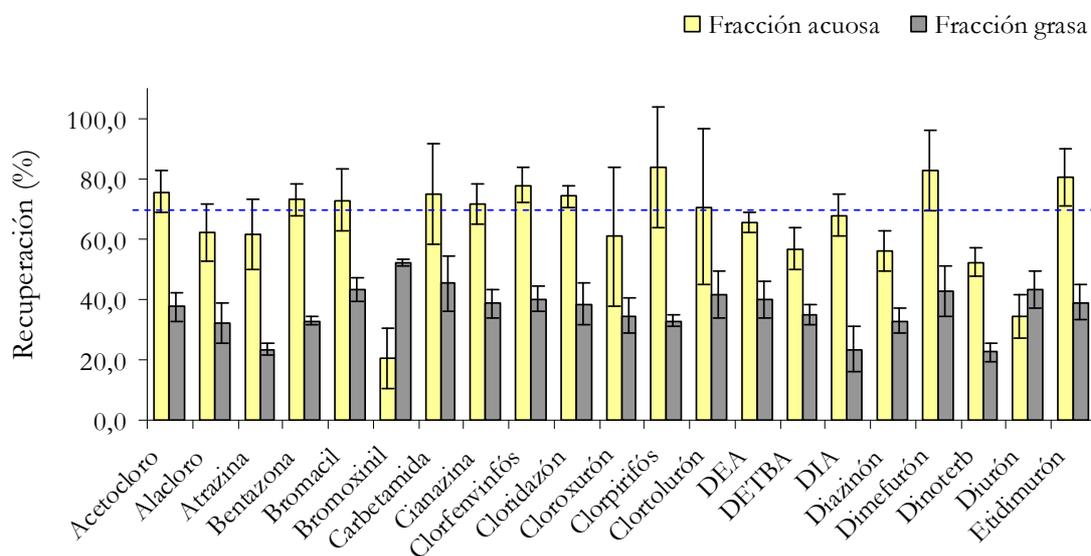
de media hora, tiempo suficiente para que el metanol adicionado se evaporara y permitir además la interacción entre los analitos y la matriz.

En cuanto a la **fracción acuosa**, del volumen total se cogieron 200 mL que se fortificaron con la misma solución metanólica usada con la nata, para obtener en este caso una concentración en la muestra de **2 ng mL⁻¹**.

2.5.1.3. Aplicación de la DSPE: estudio de recuperación.

El protocolo de **DSPE** descrito fue aplicado a **ambas fracciones de forma individual** sin incluir ningún tipo de variación en el procedimiento para el caso de la fracción acuosa, si bien hubo que fijar la cantidad de nata a extraer. En base a la experiencia adquirida en la aplicación de la DSPE, se estimó que sería adecuado utilizar 2 gramos de nata, de acuerdo con la proporción de disolventes y adsorbentes utilizados.

De esta forma, a raíz la fortificación de cada una de las fracciones, se esperaría una concentración de 10 ng mL⁻¹ en cada uno de los extractos si la recuperación de los analitos fuera del 100%. Dada la alta proporción de agua en las muestras de leche, cabe esperar que el método de DSPE funcione mejor para la fracción acuosa, si bien es posible que no se ajuste del todo correctamente a la fracción grasa.



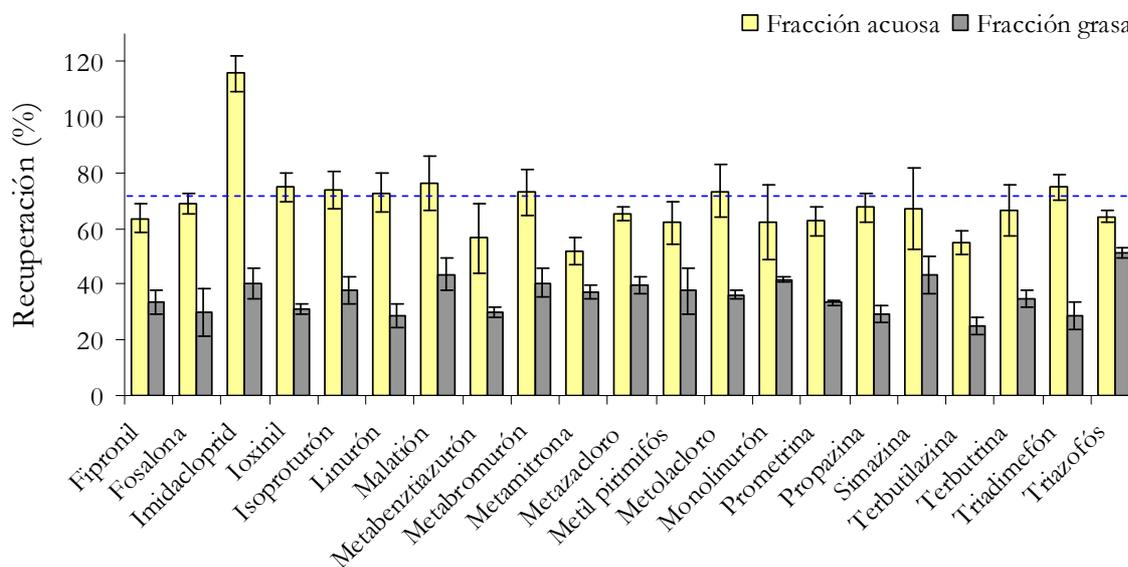


Figura IV.A.11. Recuperaciones calculadas en la fracción acuosa y lipídica de la leche cruda.

Como se puede observar en la gráfica anterior, las recuperaciones obtenidas no fueron del todo satisfactorias puesto que el protocolo aplicado se ha desarrollado para una muestra de leche con todos sus componentes. A pesar de ello, en muchos casos para la **fracción acuosa** se obtuvieron valores de recuperación superiores o muy próximos al 70% para muchos de los pesticidas evaluados. Por otra parte, aunque en la **fase lipídica** los porcentajes de recuperación fueron inferiores al 40% el método aplicado a estas matrices resultó ser bastante preciso, con valores de RSD inferiores al 15% en ambos casos por lo que procedió a la cuantificación de los analitos detectados en ambas fracciones.

2.5.1.4. Evaluación del reparto de los analitos entre ambas fases.

Para evaluar el **reparto de los analitos** se fortificó una muestra de 60 mL de leche a un nivel de 2 ng mL^{-1} , y tras las etapas de homogenización y reposo de la muestra descritas para leche cruda, se procedió a separar ambas fracciones aplicando centrifugación.

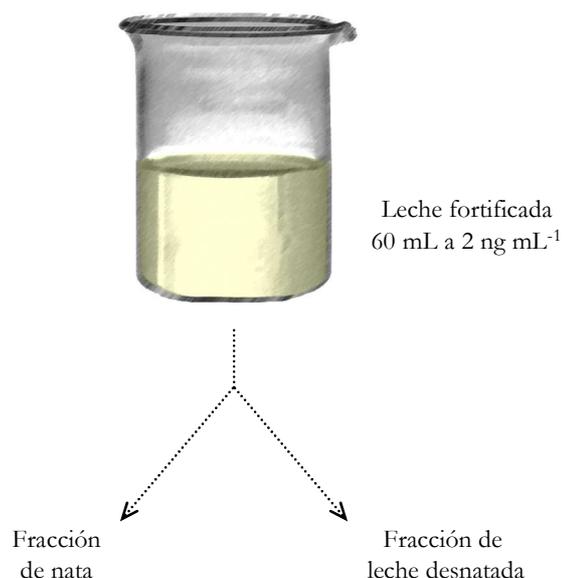


Figura IV.A.12. Procedimiento de fortificación para el estudio de distribución de los pesticidas en la leche cruda.

El método de DSPE se aplicó a las fracciones resultantes (al total de nata separada, aproximadamente 2 gramos, y a una alícuota de 5 mL de la fracción desnatada) y a partir de los valores de concentración calculados, corregidos con las recuperaciones obtenidas, se determinó la proporción de analito que migra a la fase lipídica, expresada en porcentaje en base a las cantidades de compuesto (en ng) en las dos fracciones.

Tabla IV.A.12. Proporción de compuesto que migra a la fracción lipídica de la leche cruda.

Compuestos	PK _{ow}	Proporción en la fracción lipídica (%)	Compuestos	PK _{ow}	Proporción en la fracción lipídica (%)
Fipronil	3,75	100,0	Bromacil	1,88	66,1
Dinoterb	1,91	100,0	Cloroxurón	3,40	60,9
Alacloro	3,09	97,9	Monolinurón	2,20	56,8
Acetocloro	4,14	93,9	Metabenziazurón	2,64	55,0
Malatión	2,75	93,6	DETBA	1,51	48,5
Terbutrina	3,65	92,1	Cianazina	2,10	44,7
Clorfenvinfós	3,80	91,8	DIA	2,30	40,2
Diazinón	3,69	90,4	Simazina	2,30	38,3
Terbutilazina	3,40	90,3	Clortolurón	2,50	37,6
Triadimefón	3,18	89,8	Dimefurón	2,51	37,1
Prometrina	3,34	89,4	Diurón	2,87	33,5
Fosalona	4,01	89,2	Isoproturón	2,50	31,9
Triazofós	3,55	88,6	Metamitrona	1,44	22,7
Metil pirimifós	3,90	88,2	DEA	1,15	19,8
Linurón	3,00	87,8	Ioxinil	2,20	14,6
Clorpirifós	4,70	87,8	Carbetamida	1,67	10,5
Propazina	3,95	87,0	Etidimurón	-0,22	8,7
Metolacloro	3,40	86,2	Bromoxinil	1,04	5,2
Atrazina	2,70	72,3	Bentazona	-0,46	4,4
Metazacloro	2,49	68,6	Cloridazón	1,19	3,0
Metabromurón	2,41	67,8	Imidacloprid	0,57	0,0

Queda patente la alta liposolubilidad de compuestos como fipronil o dinoterb, además de algunas triazinas (terbutrina y terbutilazina), organofosorados (malatión y clorfenvinfós) y cloroacetanilidas (acetocloro y alacloro) entre otros. Algunos pesticidas como la cianazina, metabenziazurón o metabolitos de la triazina muestran una distribución equitativa entre ambas porciones. Los valores obtenidos para las ureas sustituidas, indican un comportamiento intermedio, con distribuciones hacia la fracción lipídica comprendida por lo común entre el 60 y 30% mientras que la transferencia a la fracción hidrofílica por parte de compuestos como bentazona, imidacloprid o cloridazón es casi total.

El comportamiento observado para los compuestos estudiados está en concordancia con el esperado teóricamente en base a los valores de los coeficientes de partición octanol-agua (K_{ow}). Como se puede observar, hay una tendencia clara de los compuestos que presentan valores de PK_{ow} superiores a 3 a ser transferidos a la parte grasa de la leche en una proporción de, al menos, 80%; por otra parte, aquellos pesticidas cuyo valor de PK_{ow} resulta inferior a 2, exhiben un carácter marcadamente hidrofílico con transferencias muy pobres a la porción lipídica (generalmente inferiores al 20% salvo bromacil y DETBA). Por último, aquellos que tienen valores comprendidos entre 2 y 3 muestran un comportamiento intermedio, repartiéndose más o menos por igual entre ambas fracciones.

Hay que tener en cuenta que los valores teóricos de K_{ow} están referidos a unas condiciones experimentales concretas (pH neutro y 20°C) que difieren de aquellas con las que se llevaron a cabo las determinaciones. El hecho de mantener la muestra de leche a 4°C y el carácter ligeramente ácido de la misma, hace que el comportamiento observado difiera a veces del teórico, en función de cómo afecta la variación de las condiciones experimentales a los compuestos tratados. Por ejemplo, el dinoterb se transfiere totalmente a la fracción lipídica, pero tiene un valor teórico de $\log K_{ow}$ de 1,91.; en cambio, en condiciones ácidas (pH 4), el valor del coeficiente de reparto registrado para este mismo compuesto es de 3,46 [30], el cual se ajusta más al comportamiento observado.

3. TRABAJOS RELACIONADOS CON LA INVESTIGACIÓN DESARROLLADA.

El proyecto de investigación en el cual estuvo inmerso el estudio de leche de vaca, comprendió también un trabajo desarrollado por María Fernández Álvarez en el Instituto de Investigación y Análisis Alimentarios (IIAA) de la Universidad de Santiago de Compostela, en relación a la determinación de, mayormente, pesticidas organofosforados y piretroides en muestras de leche y de pienso de las mismas 23 explotaciones que fueron evaluadas en el trabajo mostrado para leche de vaca.

Se llevaron a cabo en este marco de investigación, trabajos en colaboración con la Universidad de Santiago de Compostela de los que ha surgido una publicación conjunta entre ambos grupos de investigación acerca de un trabajo desarrollado sobre muestras de pienso. La aportación se presenta en los Anexos de esta Tesis (Capítulo VI).

4. BIBLIOGRAFÍA.

[1] Pesticide EU-LMRs Database, European Union, Brussels, 2008
<http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm>

[2] John, P.; Bakore, N.; Bhatnagar, P.; Assessment of organochlorine pesticide residue levels in dairy milk and buffalo milk from Jaipur City, Rajasthan, India, *Environment International*; 26, 2001, pp. 231-236.

[3] A. Polder, A.; Skaare, J.; Skjerve, E.; Løken, K.; Eggesbø, M.; Levels of chlorinated pesticides and polychlorinated biphenyls in Norwegian breast milk (2002–2006), and factors that may predict the level of contamination; *Science of The Total Environment*; 407, 2009, pp. 4584-4590.

[4] Maitre, M.; De la Sierra, P.; Lenardon, A.; Enrique, S.; Marino, F.; Pesticide residue levels in Argentinian pasteurised milk; *The Science of The Total Environment*; 155, 1994, pp. 105-108.

[5] Szyrwińska, K.; Lulek, J.; Exposure to specific polychlorinated biphenyls and some chlorinated pesticides via breast milk in Poland; *Chemosphere*; 66, 2007, pp. 1895-1903.

[6] Fernandez-Alvarez, M.; Llompart, M.; Lamas, J.; Lores, M.; Garcia-Jares, C; Cela, R.; Dagnac, T.; Development of a solid-phase microextraction gas chromatography with microelectron-capture detection method for a multiresidue analysis of pesticides in bovine milk; *Analytica Chimica Acta*; 617, 2008, pp. 37-50.

[7] Mallatou, H.; Pappas, C.; Kondyli, E.; Albanis, T.; Pesticide residues in milk and cheeses from Greece; *Science of The Total Environment*; 196, 1997, pp. 111-117

[8] Kan, C.; Meijer, G.; The risk of contamination of food with toxic substances present in animal feed; *Animal Feed Science and Technology*; 133, 2007, pp. 84-108.

[9] Kituyi, E.N.; Wandiga, S.O.; Jumba, I.O. Occurrence of chlorfenvinphos residues in cow's milk sampled at a range of sites in Western Kenya. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*; 58, 1997, pp.969-975.

[10] Cardeal, Z.; Dias-Paes, C.; Analysis of organophosphorus pesticides in whole milk by solid phase microextraction gas chromatography method; *J. Environ. Sci. Health., Part B*; 41, 2004, pp. 369-375.

- [11] Salas, J.; Gonzalez, M.; Noa, M.; Perez, N.; Diaz, G.; Gutierrez, R.; Zazueta, H.; Osuna, I.; Organophosphorus pesticide residues in mexican commercial pasteurized milk; *Agric. Food Chem*; 51, **2003**, pp. 4468-4471.
- [12] Di Muccio, A.; Pelosi, P.; Camoni, I.; Barbini, D.; Dommarco, R.; Generali, T.; Ausili, A.; Selective solid-matrix dispersion extraction of organophosphate pesticide residues from milk; *Journal of Chromatography A*, 754, **1996**, pp. 497-506.
- [13] Khay, S.; Abd El-Aty, A.M.; Choi, J.-H.; Shin, E.-H.; Shin, H.-C.; Kim, J.-S.; Chang, B.-J.; Lee, C.-H.; Shin, S.-C.; Jeong, J.Y.; Shim, J.-H.; Simultaneous determination of pyrethroids from pesticide residues in porcine muscle and pasteurized milk using GC; *J. Sep. Sci*; 32, **2009**, pp. 244-251.
- [14] Bushway, R.; Perkins, L.; Hurst, H.; Ferguson, B.; Determination of atrazine in milk by immunoassay; *Food Chemistry*; 43, **1992**, pp. 283-287.
- [15] Balduini, L.; Matoga, M.; Cavalli, E.; Seilles, E.; Riethmuller, D.; Thomassin, M.; Guillaume, Y.; Triazinic herbicide determination by gas chromatography–mass spectrometry in breast milk; *Journal of Chromatography B*; 794, **2003**, pp. 389-395.
- [16] McLaughlin, R.; Barringer, V.; Brady, J.; Yokley, R.; Methods of Analysis for Triazine Herbicides and Their Metabolites; *The Triazine Herbicides*; **2008**, pp. 243-274.
- [17] Pacáková, V.; Tulík, K.; Jiskra, J.; High-performance separations in the determination of triazine herbicides and their residues; *Journal of Chromatography A*; 754, **1996**, pp. 17-31.
- [18] M. Fránck, M.; Kolář, V.; Eremin, S.; Enzyme immunoassays for s-triazine herbicides and their application in environmental and food analysis; *Analytica Chimica Acta*; 311, **1995**, pp. 349-356.
- [19] Basheer, C.; Lee, H.; Hollow fiber membrane-protected solid-phase microextraction of triazine herbicides in bovine milk and sewage sludge samples; *Journal of Chromatography A*; 1047, **2004**, pp. 189-194.
- [20] Bogialli, S; Curini, R; Di Corcia, A; Laganà, A; Stabile, A; Sturchio; E.; Development of a multiresidue method for analyzing herbicide and fungicide residues in bovine milk based on solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry; *Journal of Chromatography A*; 1102, **2006**, pp. 1-10

[21] Schenck, F.; Wagner, R.; Screening procedure for organochlorine and organophosphorus pesticide residues in milk using matrix solid phase dispersion (MSPD) extraction and gas chromatographic determination. *Food Addit. Contam.*, 12, **1995**, pp. 535-541.

[22] Bogialli, S.; Di Corcia, A.; Matrix solid-phase dispersion as a valuable tool for extracting contaminants from foodstuffs; *J. Biochem. Bioph. Methods*; 70, **2007**, pp. 163-179

[23] González-Rodríguez, M.; Arrebola-Liébanas, F.; Garrido, A.; Martínez, J.; Sánchez, F.; *Anal. Bioanal. Chem.*; 382, **2005**, pp. 164-172.

[24] Lambropoulou, D.; Albanis, T.; Methods of sample preparation for determination of pesticide residues in food matrices by chromatography–mass spectrometry-based techniques: a review, *Anal. Bioanal. Chem.*; 389, **2007**, pp. 1663-1683

[25] Bogialli, S.; Curini, R.; Di Corcia, A.; Laganà, A.; Nazzari, M.; Tonci, M.; Simple and rapid assay for analyzing residues of carbamate insecticides in bovine milk: hot water extraction followed by liquid chromatography–mass spectrometry; *Journal of Chromatography A*; 1054, **2004**, pp. 351-357.

[26] Núñez, O.; Moyano, E.; Galceran, M.; LC–MS/MS analysis of organic toxics in food; *TrAC Trends in Analytical Chemistry*; 24, **2005**, pp. 683-703.

[27] Lehotay, S.; Mastovska, K.; Yun, S.; Evaluation of two fast and easy methods for pesticide residue analysis in fatty food matrices; *J. AOAC Int.*, 88, **2005**, pp. 630-638.

[28] *Commission Decision 97/747/EC* of 27 October 1997 fixing the levels, frequencies of sampling provided for by Council Directive 96/23/EC for the monitoring of certain substances, residues thereof in certain animal products.

[29] Anastassiades, M.; Lehotay, S.; Stajnbaher, D.; Schenck, F.; Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce; *J AOAC Int.*; 86, **2003**, pp. 412-431.

[30] Inclusion of chemicals in the interim prior informed consent procedure - Review of notifications of final regulatory actions to ban or severely restrict a chemical - Dinoterb: UNEP/FAO/PIC/ICRC.3/15; FAO, (Ginebra, Suiza) **2002** <<http://www.pic.int/incs/ICRC3/s%29/English/ICRC3.15.PDF>> (Consulta: 12-02-2010)

IV.B. DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE PESTICIDAS EN MIEL Y POLEN

El segundo eje de estudio relativo a la seguridad alimentaria tiene como objetivo evaluar la presencia de residuos de insecticidas en muestras recogidas en apiarios de Galicia, desarrollando una labor de investigación enmarcada en un proyecto estratégico promovido desde la Consellería de medio Rural de la Xunta de Galicia, que lleva por título “**Estudio epidemiológico sobre el síndrome de despoblamiento de las abejas de miel en Galicia**”. El estudio se ha desarrollado en colaboración con otras entidades y laboratorios a nivel estatal e internacional (Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo, Centro Regional Apícola de Machamalo, Universidad de Valladolid, Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, el Laboratorio de Patología Apícola del Centro Apícola Regional y el Departamento de Epidemiología de la empresa Tragega, así como el Food and Environment Research Agency de York).

En concreto, la aportación a este estudio y presentada en esta Memoria tiene como objetivo el esclarecer la contribución de los insecticidas nicotinoides y el fipronil al despoblamiento de las abejas.

Los resultados obtenidos han sido publicados recientemente bajo el título “**Validation of an off line solid phase extraction liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of systemic insecticide residues in honey and pollen samples collected in apiaries from NW Spain**” (*Anal. Chim. Acta*, actualmente en proceso de impresión).

1. PARTE EXPERIMENTAL	- 169 -
1.1. PATRONES EMPLEADOS. PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES..	- 169 -
1.2. TOMA DE MUESTRA.....	- 170 -
1.2.2. Fortificación de las muestras.	- 171 -
1.3. PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN UTILIZADO	- 171 -
1.4. DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN.....	- 173 -
2. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	- 174 -
2.1. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS..	- 174 -
2.2. PRUEBAS PREVIAS.....	- 184 -
2.2.1 Optimización del proceso de extracción para la muestra de miel centrifugada	- 184 -
2.2.3.1 Cantidad de muestra extraída	- 185 -
2.2.3.2. Diseño experimental	- 186 -
2.2.4 Evaluación del efecto matriz.	- 189 -
2.3. PARÁMETROS DE CALIDAD DEL MÉTODO.....	- 192 -
2.3.1 Linealidad.	- 194 -
2.3.2 Exactitud y precisión.	- 196 -
2.3.3. Repetibilidad y reproducibilidad.	- 197 -
2.3.4 Límite de decisión ($CC\alpha$) y capacidad de detección ($CC\beta$).....	- 198 -
2.4. APLICACIÓN AL ESTUDIO DE MUESTRAS DE MIEL DE APIARIOS DE GALICIA	- 200 -
2.4.1. Preparación de la muestra.	- 201 -
2.4.2. Análisis de muestras reales.....	- 203 -
3. BIBLIOGRAFÍA	- 206 -

La dirección que ha tomado en las últimas décadas la utilización de productos agroquímicos para el control de plagas, sigue una línea hacia la aplicación de sustancias resulten cada vez menos nocivas para el hombre y el entorno, siendo igualmente eficaces en su acción fitosanitaria. Esto ha potenciado el empleo de ciertos insecticidas como alternativa a organofosforados y metilcarbamatos. Uno de ellos es el **fipronil**, fenilpirazol de acción sistemática aplicado en cultivos de maíz o girasol, en tratamiento de semillas para la lucha contra insectos, con una baja persistencia en suelos debido a su fácil metabolización en otros productos que resultan a veces más nocivos y persistentes.

Otro compuesto utilizado ampliamente en estos cultivos es el **imidacloprid**, perteneciente al grupo de los neonicotinoides, compuestos químicos derivados de la nicotina, que produce una alteración en el sistema nervioso de insectos que devoran maizales, frutales o succionan la savia de árboles como el eucalipto, incluso cuando la dosis utilizada es muy baja [1]. La nicotina sobreexcita, paraliza y mata a especies indeseadas para los cultivos, pero al mismo tiempo afecta a insectos polinizadores necesarios en la agricultura.

Actualmente el imidacloprid está siendo sustituido por el del **tiametoxam** que pertenece a la misma familia química, por lo que tiene el mismo efecto sobre las plagas pero resulta más seguro para otros organismos como revela la comparación del valor de LD₅₀ en abejas para ambos compuestos [2].

Uno de los grandes problemas asociados a estos insecticidas es que podrían provocar la muerte de insectos beneficiosos para el medio y para la agricultura. Este es el caso de mariquitas, abejas y otros insectos polinizadores, cuyo número de individuos se ha visto drásticamente disminuido en los últimos años [3, 4], produciéndose un fenómeno que, en el caso de las abejas, es conocido como **“Síndrome de despoblamiento de las colmenas”** (CCD, del inglés Colony Collapse Disorder). El CCD consiste en el despoblamiento paulatino de las colmenas debido a factores que no han sido exactamente definidos. Se ha observado que las abejas se desorientan y no son capaces de volver al enjambre, o bien su respuesta inmune se ve disminuida volviéndose totalmente vulnerables a la acción de parásitos, virus o bacterias... Las causas de este comportamiento aún no están del todo determinadas, pero hasta hace poco se suponía que parte de culpa residía en ciertos pesticidas [5], cuyo efecto sobre el despoblamiento de las abejas, se estimaba fuese más importante que el que pudieran producir el conjunto de todos los depredadores naturales de estos insectos (hormigas, lagartijas, ranas, parásitos...) [6]

La contaminación de las colmenas puede producirse de una forma directa (por aplicación de productos que las protejan de organismos indeseados) o debido a la **contaminación cruzada con agroquímicos aplicados a cultivos**. Las abejas desarrollan su

actividad polinizadora en un radio de unos 3 a 6 km alrededor del panal, lo que propicia el contacto con sustancias aplicadas en zonas relativamente lejanas [7].

Además del néctar y polen, estos insectos pueden transportar sustancias nocivas adheridas a sus patas o abdomen que más tarde se depositan sobre la cera del panal o sobre la miel almacenada en el mismo. Ésta es utilizada como fuente energía para las abejas, lo que implica que la contaminación no solo se realiza por inhalación o contacto sino que también se efectúa por vía digestiva. Por todo ello, los pesticidas aplicados a cultivos son susceptibles de provocar efectos tóxicos sobre los individuos de la colmena, incluso a dosis bajas [8, 9].

La miel es un producto ampliamente comercializado y utilizado para la alimentación del hombre, por lo que es necesario tener en cuenta el riesgo implícito para la salud humana. Por lo tanto se hace necesario que los niveles de ciertos insecticidas en estos productos se vean regulados. Con este objetivo, el Reglamento 839/2008/CE establece el **valor máximo de residuo permitido para 109 pesticidas en miel**, entre los cuales se incluyen tiametoxam, imidacloprid, fipronil y fipronil sulfona.

Se han encontrado residuos de estos compuestos en distintas matrices medioambientales y en muestras de alimentos, entre otros, miel comercial, abejas, polen y matrices relacionadas con el ámbito de la apicultura [10 - 16]. El estudio bibliográfico revela diversos métodos de tratamiento de muestra aplicados en el estudio de estas matrices, con la utilización de extracción líquido-líquido convencional, extracción asistida por ultrasonidos, SPE, SPME o MSPD [15 - 19]. Resulta habitual en estos procedimientos realizar un pretratamiento de muestra consistente en calentar las muestras de miel a tratar o diluirlas con distintos disolventes o mezclas de los mismos en varias proporciones. Además, se aplican comúnmente técnicas de limpieza de extractos debido a la cantidad de interferencias presentes tanto en muestras como en extractos [10, 11 - 17, 20]. El estudio bibliográfico revela que la cromatografía líquida con detección por espectrometría de masas resulta la técnica más empleada en los últimos años para cuantificar y determinar los residuos de pesticidas en estas matrices [10 - 28].

1. PARTE EXPERIMENTAL

1.1. PATRONES EMPLEADOS. PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES.

Los compuestos en los que se centra este capítulo son el **fipronil** y cuatro de sus metabolitos (**sulfona**, **sulfuro**, **desulfenil** y **carboxamida**), **imidacloprid** y **tiametoxam**.

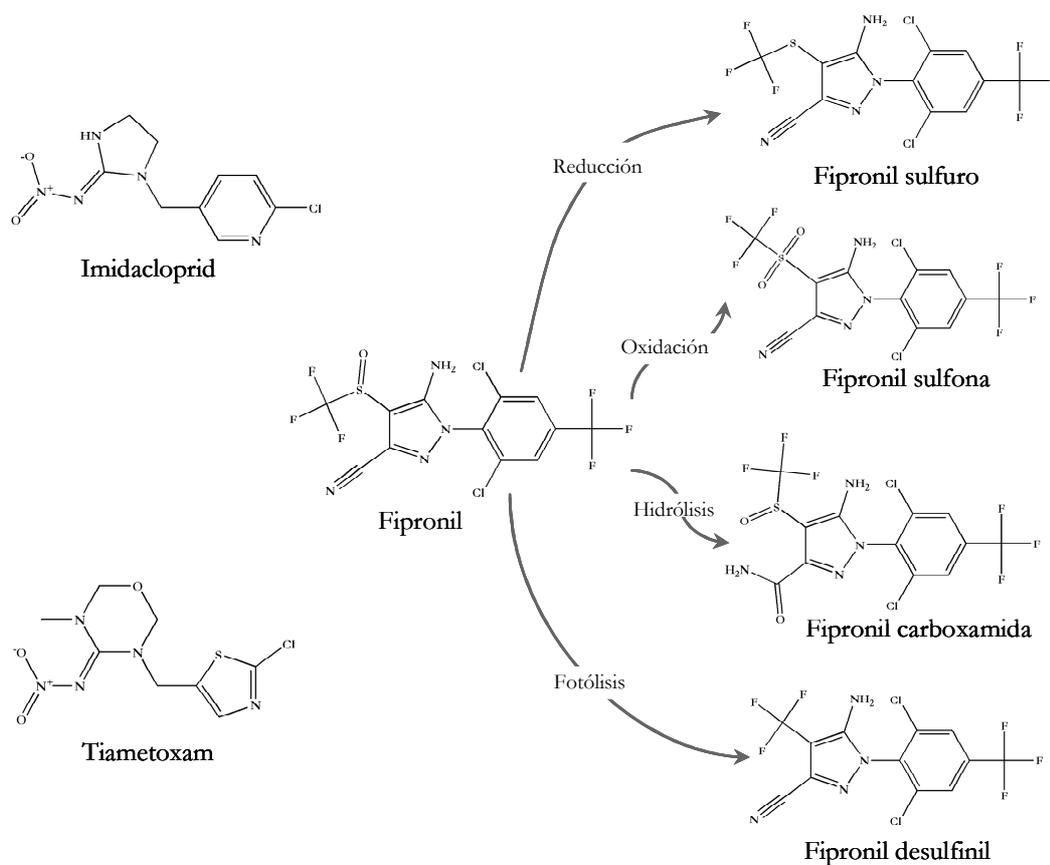


Figura IV.B.1. Estructura de los compuestos estudiados

El fipronil pertenece a la familia de los fenilpirazoles mientras que el tiametoxam e imidacloprid son dos neonicotinoides. Las propiedades de estos compuestos se recogen en los anexos de esta Memoria.

En esta ocasión se disponía de patrones individuales de todos los compuestos, por lo que se prepararon soluciones metanólicas de cada uno de ellos a una concentración de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. Por dilución y combinación de éstas, finalmente se obtuvo una mezcla de concentración $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ para midacloprid y $0,3 \mu\text{g mL}^{-1}$ para el resto de compuestos, a partir de la cual se prepararon todas las disoluciones de trabajo.

Las mezclas para fortificación de muestras (todo lo referente a pruebas previas y evaluación de los parámetros de calidad del método analítico) fueron soluciones metanólicas. Sin embargo los patrones de calibración se prepararon en una mezcla de igual composición a la fase móvil en el momento de la inyección, es decir, MeOH:H₂O (30:70) tamponada con HCOOH /HCOO⁻ (0,15% ácido fórmico, 3mM de formiato amónico).

Se ha utilizado un compuesto marcado con deuterio como subrogado, en este caso [²H₄]-Imidacloprid, que se ha añadido a las muestras previamente a la aplicación del método de extracción para evaluar la eficacia del mismo.

1.2. TOMA DE MUESTRA

La Comisión Europea establece en la **Decisión 97/747** cómo proceder al muestreo en el caso toma de muestras de miel [33]. Bajo estas especificaciones, los técnicos del *Consello*

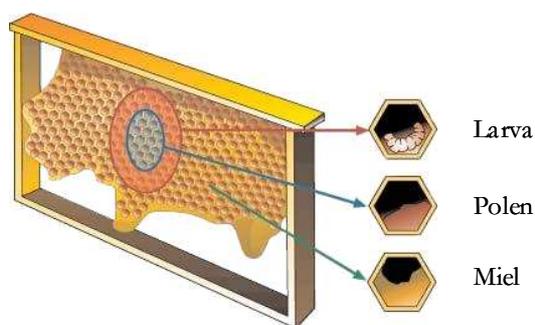


Figura IV.B.2. Estructura interna de un panel de miel en cuanto a la ocupación de las celdas.

Regulador de Mel de Galicia, recogieron porciones de enjambres en **73 explotaciones de apicultores gallegos**, en dos campañas de muestreo realizadas durante el año 2008 teniendo en cuenta el censo apícola oficial de Galicia. Se llevó a cabo la recogida de **porciones de panal de la cámara de cría de la colmena** conteniendo los distintos constituyentes de la misma. Las muestras se introdujeron en botes de análisis esterilizados de 50 mL que se almacenaron en el congelador a -20°C hasta el momento de su procesado.

1.2.2. Fortificación de las muestras.

La realización de **pruebas preliminares** que determinan el comportamiento de los analitos en la muestra se llevó a cabo sobre productos comerciales relacionados con la matriz objeto de estudio, en concreto miel y polen comercializados bajo la misma marca. Para la realización de estos ensayos, distintas cantidades de ambas muestras (desde 1 a 10g) se fortificaron con los pesticidas seleccionados en rangos de concentraciones desde 1 a 30 ng g⁻¹ dependiendo del caso.

La optimización de la metodología analítica se realizó meses antes a la recepción de las muestras de las 73 explotaciones de apicultores, por lo que la etapa de **validación** se llevó a cabo sobre muestras de **miel “casera”** de la zona de A Estrada (centrifugada por apicultores con centrífugas especiales para la extracción de miel de los panales) que no está sometida a ningún tratamiento industrial que pueda afectar a los constituyentes de la misma. La fortificación de las muestras para realizar pruebas preliminares y la validación del método propuesto, se llevó a cabo adicionando a un gramo de miel, 100 µl de una solución metanólica que contenía todos los compuestos.

Tal y como se ha comprobado al realizar la revisión bibliográfica, es necesario **calentar la miel** para reducir su viscosidad y facilitar así la interacción entre analito y matriz. Por lo tanto, previamente a la fortificación, la muestra se calentó a 35-40°C en un baño. Una vez realizada la fortificación, se agitó mecánicamente un tiempo suficiente para homogeneizar la mezcla (30-40 segundos) y se dejó reposar a temperatura ambiente durante media hora. Pasado este tiempo se aplicó el procedimiento de extracción que se describe en el apartado siguiente.

Para el caso del polen, la adición de los analitos se lleva a cabo en un tubo Falcon. La mezcla conteniendo los compuestos de interés se homogeneiza mediante agitación con Vortex durante unos 10-20 segundos. Se deja reposar durante media hora a temperatura ambiente, tiempo suficiente para que la muestra de polen presente un aspecto “seco”, como el que tenía al principio.

1.3. PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN UTILIZADO

El método propuesto consistió en una **SPE con florisil** de 1 gramo del resto centrifugado de la muestra de miel, diluido con una mezcla de metanol y agua. Al igual que para el método desarrollado para leche desnatada (IV.A.1) se ha utilizado un sistema de vacío

(Visiprep, Supelco) para realizar la SPE. El proceso esquematizado en la figura siguiente consta de las etapas descritas a continuación.

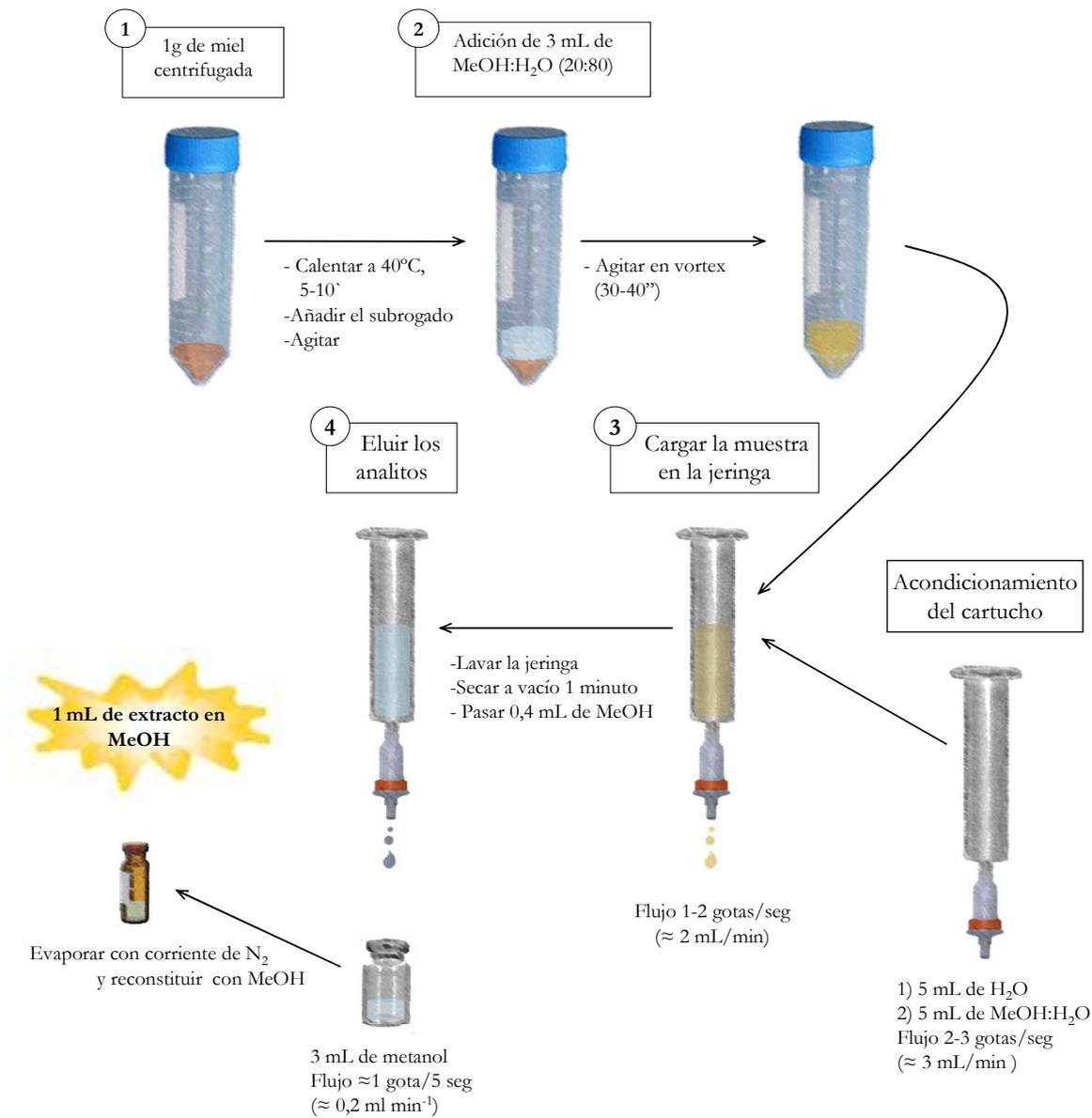


Figura IV.B.3. Procedimiento de extracción de miel por SPE.

En un tubo Falcon se introduce un gramo de muestra que se fortifica con el subrogado y los compuestos según lo descrito anteriormente. Antes de proceder a la extracción, se vuelve a calentar la muestra fortificada para propiciar la mezcla con 3 mL de MeOH:H₂O (20:80) que se añaden al tubo Falcon. Se agita mecánicamente durante 30-40 segundos y el contenido del tubo se introduce en una jeringa con una frita en el fondo, acoplada a un cartucho de florisil que ha sido previamente acondicionado con 5 mL de metanol y 5 mL de agua. Tras pasar la mezcla a través del cartucho, se arrastran a la jeringa los restos que pudieran quedar en el tubo con 5 mL de MeOH:H₂O y después se lava el cartucho con 5 mL de agua. Se seca a vacío durante 5 minutos y se añaden 400 µl de metanol para eliminar la humedad residual del cartucho. Los compuestos se eluyen con 5 mL de metanol, que se evaporan a sequedad bajo corriente de nitrógeno y se reconstituyen nuevamente con 1 mL de una mezcla cuya composición es la de la fase móvil en el momento de la inyección.

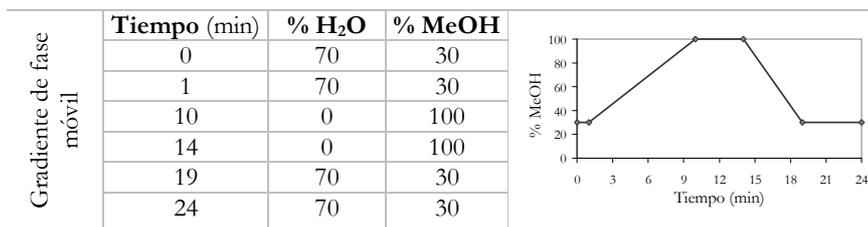
El extracto obtenido, que contiene los analitos en la misma concentración que en la muestra, se analiza directamente en el LC-MS/MS o se congela a -20°C hasta el momento de su análisis.

1.4. DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN.

La detección y cuantificación de los compuestos se llevó a cabo utilizando el mismo cromatógrafo de líquidos Thermo Fisher Scientific que se ha descrito en el apartado anterior para el análisis de residuos en muestras de leche de vaca. Las condiciones cromatográficas se resumen en la siguiente tabla.

Tabla IV.B.1. Condiciones cromatográficas y del detector MS/MS empleadas para la determinación de los analitos.

COLUMNA		
Symmetry Shield (Waters)	Fase estacionaria	C ₁₈
	Dimensiones	150×2,1mm
	Tamaño de partícula	3,5 µm
	Tamaño de poro	100 Å
FASE MÓVIL		
Régimen	Gradiente	
A	Agua tamponada con ácido fórmico al (0,15%) y formiato amónico (3mM)	
B	Metanol “tamponado” con ácido fórmico al (0,15%) y formiato amónico (3mM)	
Flujo	200 µL min ⁻¹	
Tª	25°C	



DETECTOR		
Modo de ionización	Positivo	Negativo
Voltaje del spray (V)	3800	3000
T ^a del vaporizador (°C)	50	50
T ^a del capilar (°C)	350	350
Gas de impulsión (u.a.) ¹	35	35
Gas auxiliar (u.a.)	2	2
Voltaje del <i>skimmer offset</i> (V)	0	0
Tiempo de escaneo (ms)	10	10
Cono de barrido de iones (u.a.)	2	0

¹unidades arbitrarias (u.a.)

El volumen de inyección fue de 10 μ L, tanto en el caso de patrones como de extractos.

2. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

2.1. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

Dado que el equipo de análisis es el mismo que se ha utilizado para evaluar las muestras de leche, se han tomado en consideración los mismos parámetros a optimizar bajo la actuación descrita en el capítulo anterior (sección IV.A.2.1)

Se optimizaron las energías de colisión para las transiciones SRM más intensas de cada compuesto, mediante la infusión de una solución metanólica a 1 μ g mL⁻¹. Estas transiciones fueron utilizadas para detectar y confirmar, así como cuantificar los analitos.

Tabla IV.B.2. Transiciones SRM y energías de colisión optimizadas para la detección y cuantificación de los pesticidas estudiados.

	Primera transición				Segunda transición		
	Tr	Ionización (+ / -)	Ión precursor (m/z)	Ión producto (m/z)	Energía de colisión (V)	Ión producto (m/z)	Energía de colisión (V)
Fipronil	12,2	HESI-	435,0	330,0	18	250,0	28
Fipronil carboxamida	10,7	HESI-	453,0	303,9	27	347,7	14
Fipronil desulfínil	12,2	HESI-	387,0	351,0	18	282,0	33
Fipronil sulfuro	12,5	HESI-	419,0	262,0	29	314	21
Fipronil sulfona	12,6	HESI-	450,9	414,9	18	282,0	28
Imidacloprid	6,3	HESI+	256,0	209,0	17	175,0	22
Imidacloprid-D4	6,3	HESI+	260	179,2	21	215,9	21
Tiametoxam	5,2	HESI+	292,0	211,1	18	180,9	15

En total se necesitan 16 transiciones para identificar y determinar los analitos estudiados. Dado que se trata de un bajo número de transiciones, se ha incluido en algunos casos una tercera para alguno de los compuestos por lo que la identificación de los analitos en base a la proporción de intensidades de los iones se realiza de una forma más certera.

Las terceras transiciones agregadas al método se resumen a continuación.

Tabla IV.B.3. Tercera transición SRM para cuatro de los compuestos estudiados.

	Tercera transición				
	Tr	Ionización (+ / -)	Ión precursor (m/z)	Ión producto (m/z)	Energía de colisión (V)
Fipronil	12,2	HESI-	435,0	278,0	28
Fipronil carboxamida	10,7	HESI-	453,0	416,9	14
Fipronil sulfuro	12,5	HESI-	419,0	382,2	21
Fipronil sulfona	12,6	HESI-	450,9	244,0	48

Los pesticidas estudiados en este caso son ocho, tres de ellos analizados con ionización positiva y cinco con ionización negativa. Inicialmente se inyectó en el cromatógrafo un patrón preparado en metanol que contenía todos los compuestos a un nivel de concentración de 30 ng mL^{-1} . El análisis se llevó a cabo de forma independiente en modo positivo y en modo negativo. A la vista de los cromatogramas obtenidos, si bien los picos correspondientes a los pesticidas analizados con polaridad negativa presentan una forma bien definida, los analitos determinados con polaridad positiva presentaron deformaciones al principio del pico, aún a pesar de estar retenidos poco tiempo en la columna.

Seguidamente se realizó el mismo análisis con un patrón de igual concentración pero preparado esta vez en una mezcla de igual composición a la fase móvil existente en el momento de la inyección (MeOH:H₂O 30:70, 0,15% en ácido fórmico y 3mM en formiato amónico). Los resultados obtenidos al inyectar este patrón para imidacloprid, tiametoxam y el subrogado se corresponden con los picos de color naranja en la figura IV.B.4. Se puede observar que el cromatograma en discontinuo, correspondiente con el estándar en metanol, presenta una deformación al principio del pico que afecta a su correcta cuantificación y que es perfectamente corregida al preparar el estándar en fase móvil (línea naranja).

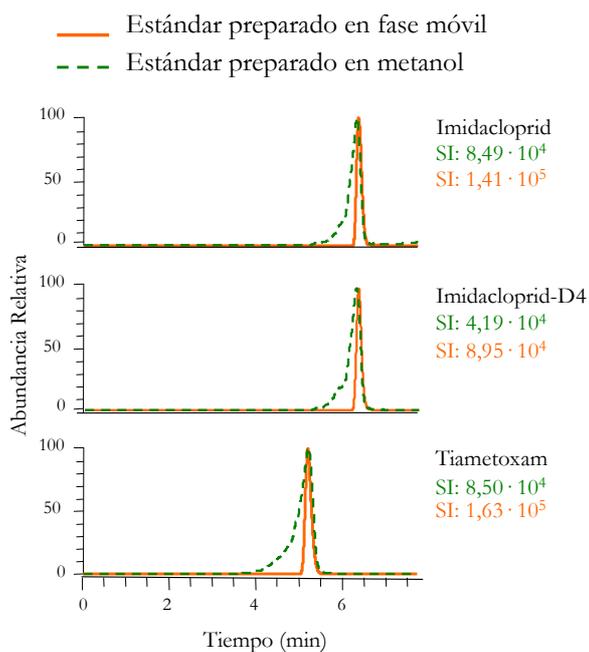


Figura IV.B.4. Superposición de dos cromatogramas en TIC, obtenidos tras el análisis de dos patrones de igual concentración preparados en fase móvil y en metanol

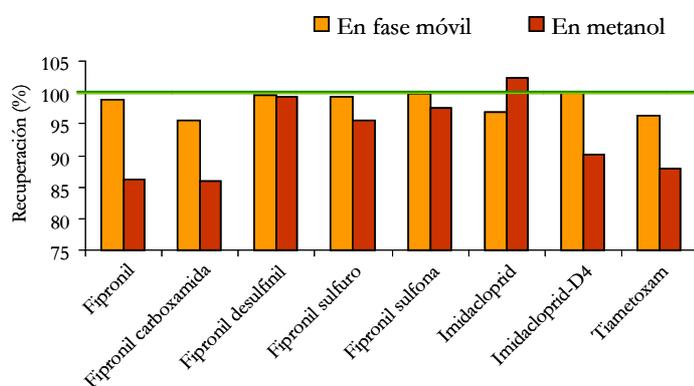


Figura IV.B.5 Recuperaciones calculadas para un patrón de concentración 30 ng mL^{-1} de todos los compuestos preparados en metanol y en fase móvil

El efecto de deformación del pico se debe a la interacción de los analitos con la fase móvil en el momento de la inyección. El volumen de inyección supone un 5% del flujo de arrastre ($10 \mu\text{L}$ en un total de 200), y afecta a la cinética de intercambio de los compuestos con el empaquetado de la columna cromatográfica, puesto que se introduce metanol puro en un flujo que solamente contiene un 30% de este disolvente. Además, existe un efecto de

difusión de los compuestos en la fase móvil que afecta más fuertemente a los analitos menos retenidos, que tienen carácter más hidrofílico. En concreto, éstos tres son eluidos con una proporción de fase móvil de aproximadamente 55:45 (metanol:agua).

Se ha comprobado que preparando los patrones en fase móvil se aumenta la intensidad de señal (SI) produciendo respuestas más sensibles, no solamente para los analitos determinados en modo HESI +, tal y como se aprecia en la gráfica de la figura IV.B.5.

Por todo ello, se ha decidido preparar tanto **patrones** para el calibrado como **extractos de muestras fortificadas** en una solución de **igual composición a la fase móvil en el momento de la inyección**.

Los compuestos que se determinan en cada uno de los modos de ionización pertenecen a la misma familia y tienen estructuras similares, por lo que los tiempos de retención son también parecidos. Esto hace que haya un “núcleo” de señales en cada uno de los cromatogramas obtenidos. Los analitos determinados en modo de ionización positivo, de m/z inferior a 300, se registran al principio del cromatograma, mientras que el fipronil y los metabolitos, con m/z superiores o cercanos a 400, se determinan a tiempos más altos.

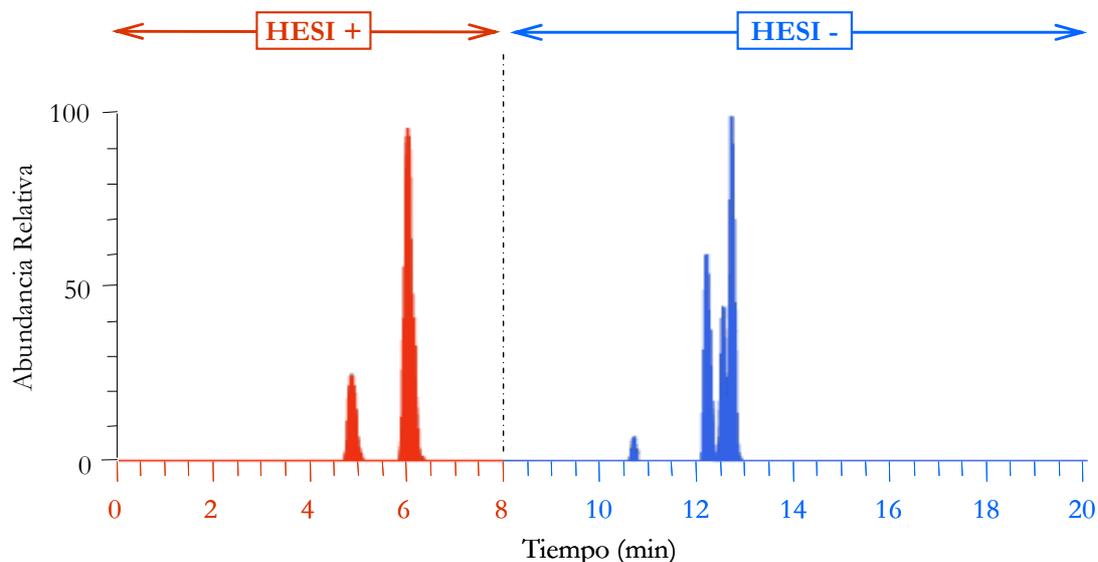


Figura IV.B.6. TIC de un patrón de 30 ng mL^{-1} obtenido a partir de una misma adquisición con dos segmentos de distintas polaridades

Como muestra el cromatograma anterior, es posible realizar la **determinación de todos los compuestos de forma conjunta**, con un solo análisis adquiriendo en los primeros 8 minutos con la fuente en modo de ionización positivo (HESI+) y a partir de este momento con ionización negativa (HESI-). La separación cromatográfica entre los pesticidas nicotinoides y el fipronil y sus metabolitos permite el cambio de polaridad de la fuente (proceso que requiere realmente de cerca de dos segundos) sin afectar a la determinación analítica. De este modo se obtienen cromatogramas como el que se muestra a continuación.

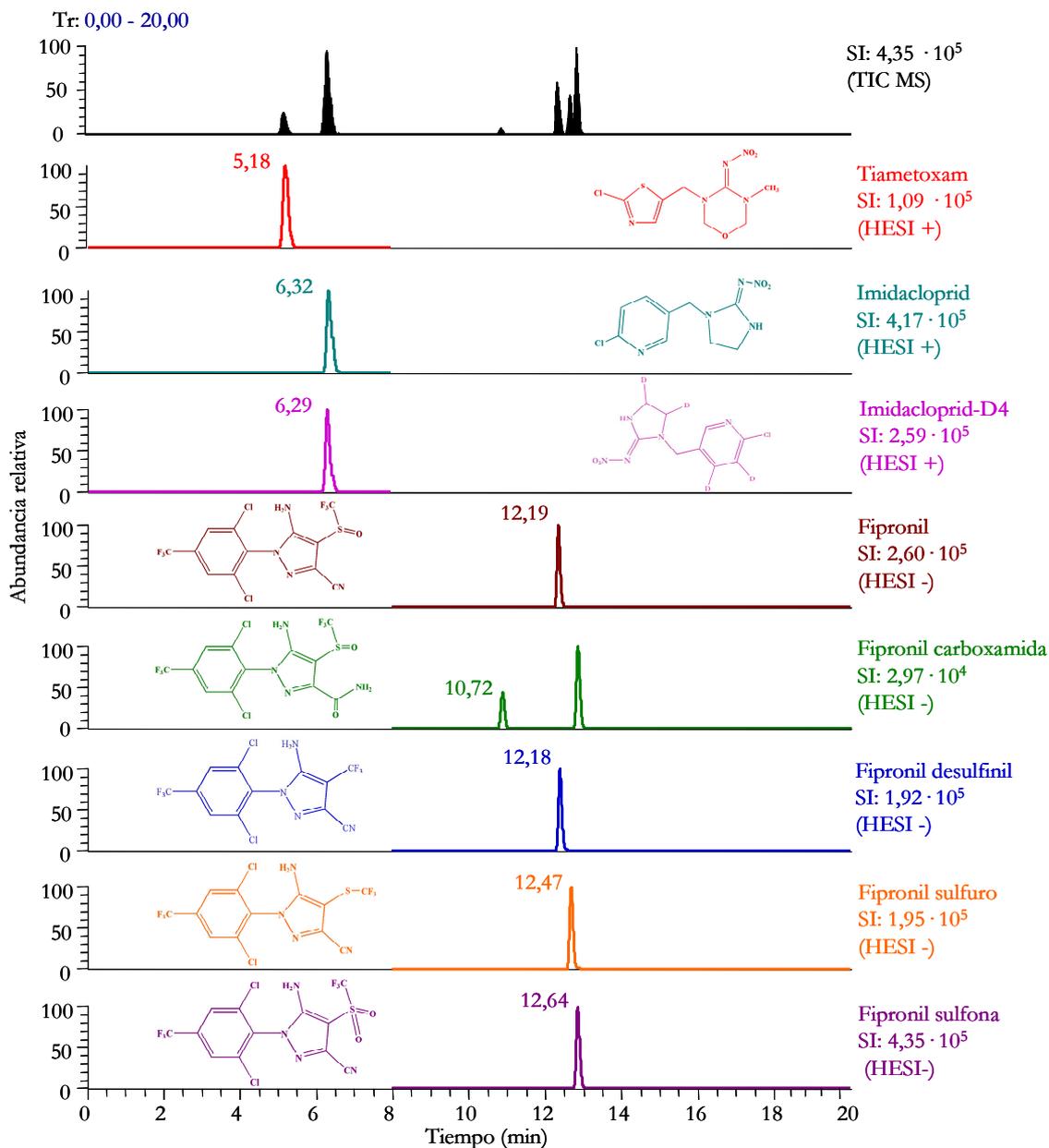


Figura IV.B.7. Cromatograma de un patrón de concentración de 50 ng g^{-1} para imidacloprid y 10 ng g^{-1} para el resto de analitos.

La señal en TIC representa el cromatograma total en donde se muestra la contribución de todas las transiciones adquiridas. Si se reconstituye el cromatograma a partir de la señal registrada para la SRM de cada uno de los analitos, se obtiene un pico cromatográfico por compuesto, a excepción del caso del fipronil carboxamida, para el cual se registran dos señales, (figura IV.B.7, cromatograma en verde), lo que indica que hay **dos compuestos** presentes en la mezcla **que responden a la transición seleccionada (453,0 → 303,9; 437,7; 416,9)**.

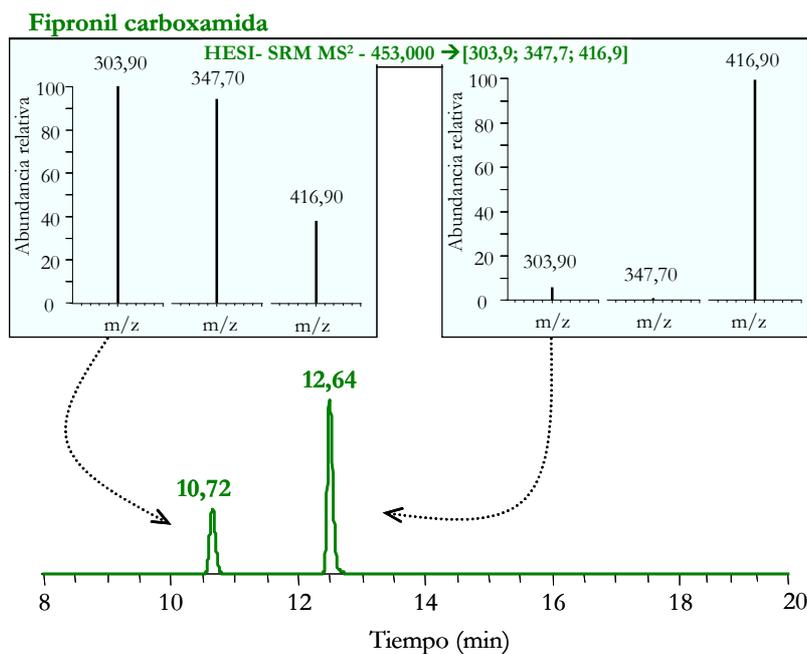


Figura IV.B.8. Señales cromatográficas y espectro de masas (SRM) obtenidos al adquirir las transiciones optimizadas para fipronil carboxamida

Para identificar cuál de los dos compuestos es el fipronil carboxamida basta con evaluar el espectro de MS² correspondiente a ambos picos cromatográficos, de forma que a partir de la proporción de intensidades de las señales se puede saber cuál es el compuesto de interés.

En este caso, el primer pico proporciona un espectro de MS² con señales cuyas intensidades relativas se corresponden con las esperadas para **fipronil carboxamida** (iones 303,9; 347,7 y 416,9 en una proporción 1:0,9:0,4). La segunda señal cromatográfica tiene el mismo tiempo de retención que el registrado para **fipronil sulfona**. De hecho, analizando un

estándar individual de este compuesto, se obtienen señales para dos transiciones distintas, tal y como se muestra en la figura IV.B.9.

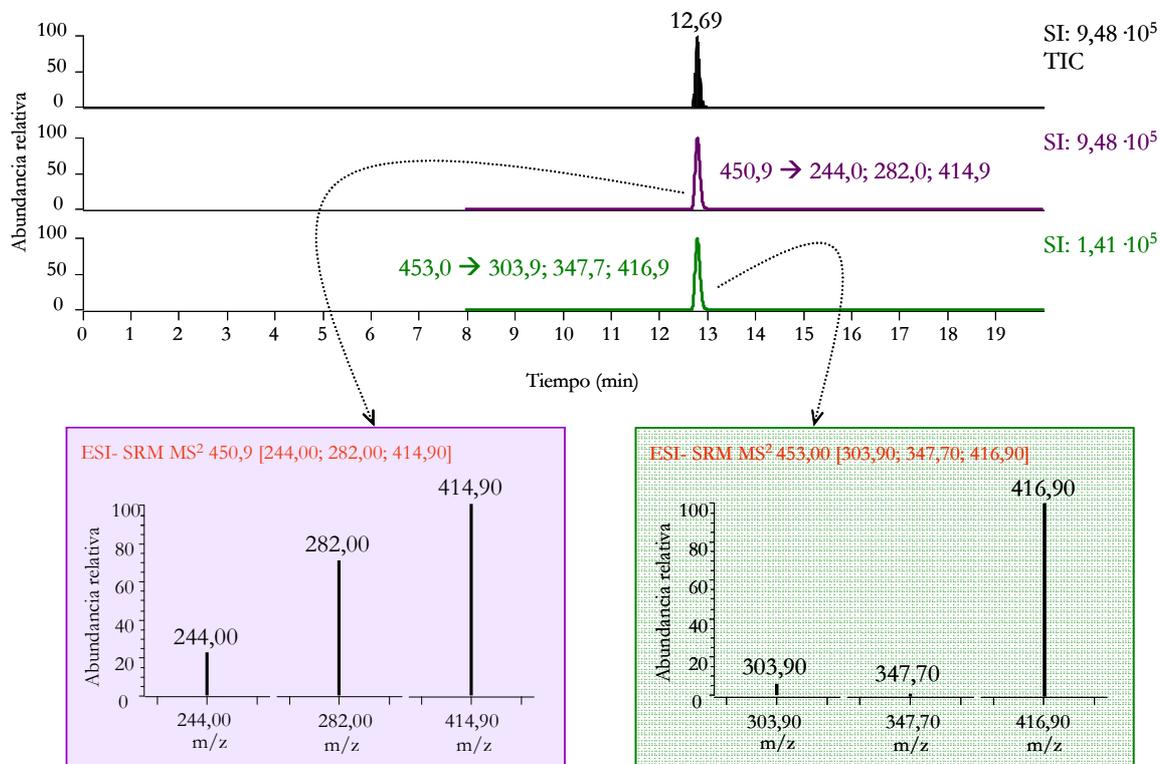


Figura IV.B.9. Señales cromatográficas y espectro de masas (SRM) obtenidos tras el análisis de un patrón de fipronil sulfona de concentración 30 ng mL^{-1}

El cromatograma en violeta representa la señal generada al adquirir las transiciones optimizadas para fipronil sulfona, mientras que el verde representa la señal generada al adquirir las transiciones optimizadas para fipronil carboxamida.

Evaluando la fragmentación de las moléculas estudiadas se comprobó la existencia de **pérdidas de m/z comunes para varios de los analitos**. Este es el caso de una pérdida de $m/z = 105$ que se produce para el fipronil y todos sus metabolitos a excepción del sulfona, y que se corresponde con la pérdida de un átomo de Cl y el grupo CF_3 . Asimismo, fipronil carboxamida, desulfinil y sulfona comparten una pérdida de $m/z = 36$ asociada a un Cl.

Debido a la similitud estructural entre el fipronil y sus metabolitos, resulta lógico pensar que los efectos electrónicos en la molécula sean parecidos y que, por lo tanto, la fragmentación se realice en el mismo punto para varios compuestos.

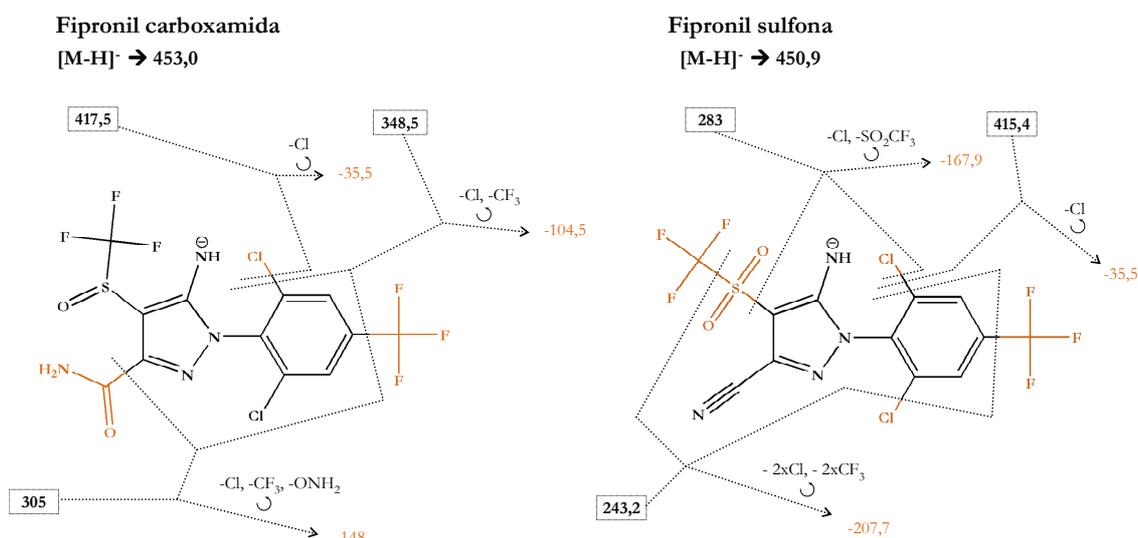


Figura IV.B.10. Fragmentación propuesta para fipronil carboxamida y fipronil sulfona.

En concreto, para fipronil carboxamida y fipronil sulfona, tal y como se muestra en la imagen, una de las transiciones optimizadas en uno y otro caso lleva asociada la pérdida de un fragmento de m/z 36, correspondiente al desprendimiento un átomo de cloro. Tanto los iones padre (450,9 y 453) como iones hijo (414,9 y 416,9) generados para cada uno de los analitos difieren en dos unidades de m/z entre sí.

Teniendo en cuenta la presencia isotópica del ³⁷Cl ocupando una de las dos posiciones en la molécula (el 37,5% de probabilidades teniendo en cuenta la abundancia de este isótopo en la naturaleza), puede atribuirse este segundo pico cromatográfico a la contribución de dicho isótopo.

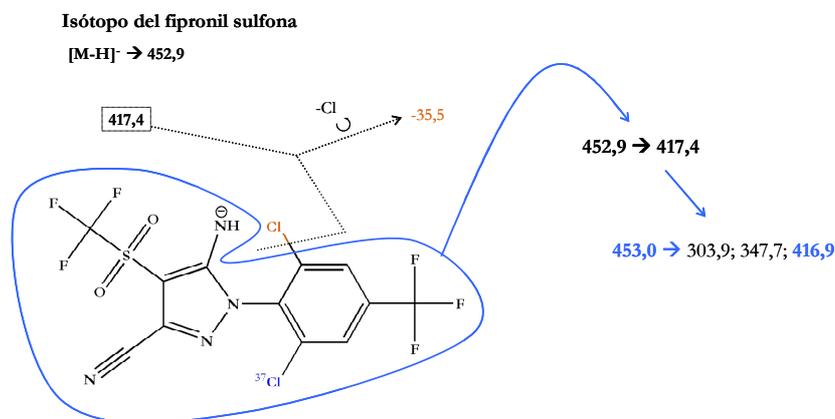


Figura IV.B.11. Fragmentación propuesta para el fipronil sulfona con un ^{37}Cl .

En este caso, el valor del ión padre aumenta de 450,9 a 452,9 (que el equipo identifica como 453), y el fragmento pasa de ser 414,9 a ser 416,9, coincidiendo de esta forma con los valores de la transición que caracterizan al fipronil carboxamida, tal y como se indica en la figura anterior. Por esta razón, el cromatograma presenta para la misma transición dos señales cromatográficas, que se asignan a los compuestos como se muestra a continuación.

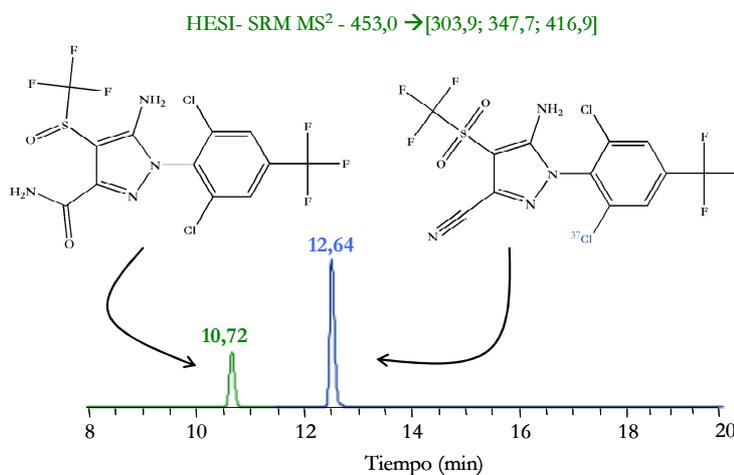


Figura IV.B.12. Compuestos asignados a las picos adquiridos para las transiciones optimizadas de fipronil carboxamida.

2.2. PRUEBAS PREVIAS

2.2.1 Optimización del proceso de extracción para la muestra de miel centrifugada

Se consideró la posibilidad de trabajar con muestras de miel centrifugada (ver apartado 1.2.2) muy parecida a la que se obtendría en el laboratorio tras centrifugar las muestras “reales” recogidas en las explotaciones.

A partir de la información extraída en la bibliografía revisada [10, 11, 15-18, 20, 23-32], se decidió trabajar con SPE como técnica de extracción de los analitos. Se planteó entonces la optimización del procedimiento de tratamiento de muestra para una porción de panal centrifugado, por lo que se llevó a cabo una SPE según el procedimiento general descrito en la figura IV.B.3, comparando distinto tipo de cartuchos, y realizando la elución con disolventes o mezclas que se usan comúnmente para extraer los analitos en muestras relacionadas con la apicultura, según la bibliografía consultada. En este caso el nivel de fortificación fue de 4 ng g⁻¹ y se extrajeron en todos los casos 2 g de muestra con 6 mL de MeOH:H₂O (20:80) (v/v).

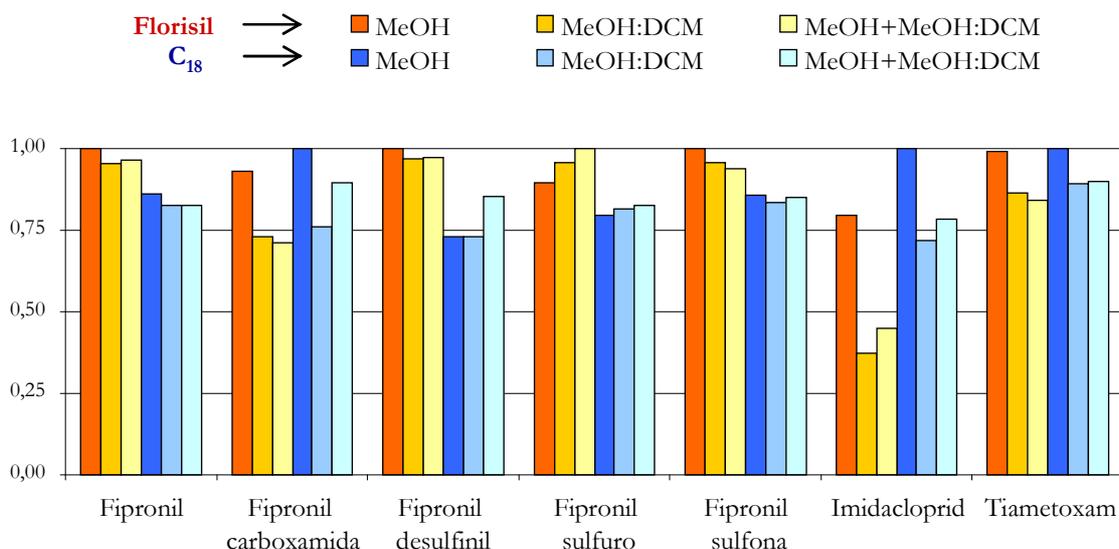


Figura IV.B.13. Recuperaciones normalizadas para extractos obtenidos a partir de una muestra de panal centrifugado, extraído con distintos tipos de cartuchos y de eluyentes.

El gráfico anterior muestra las recuperaciones normalizadas en base al porcentaje de recuperación más alto para cada compuesto. Las barras naranjas de la figura representan extractos preparados con florisil, mientras que las azules se refieren a extractos preparados con C_{18} como adsorbente en la etapa de SPE. Por otra parte, la tonalidad de las barras marca las distintas eluciones: las más oscuras (tanto naranja como azul) se refieren a SPEs en donde la elución se llevó a cabo con 3 ml de metanol; las barras de tonalidad intermedia representan las eluciones llevadas a cabo con 10 mL de una mezcla de metanol:diclorometano (15:85); por último las barras más clara representan extractos que se lograron eluyendo los analitos en dos pasos: primero con 3 mL de metanol y después con 10 mL de metanol:diclorometano (15:85).

Los resultados obtenidos revelan que la **SPE con con florisil** resultó más favorable para la mayoría de los fenilpirazoles, mientras que para imidacloprid se obtuvieron mejores resultados con C_{18} , y para tiametoxam se obtienen respuestas similares con ambos absorbentes.

En principio no se observan diferencias significativas en la respuesta al modificar el **disolvente de elución** (las tres barras anaranjadas representan valores normalizados muy parecidos entre sí para el mismo compuesto, y las barras azules también denotan este comportamiento), si bien para fipronil carboxamida, imidacloprid y tiametoxam, la elución con metanol (barras oscuras) proporciona mejores recuperaciones que los otros disolventes o mezclas utilizadas (barras claras), independientemente del cartucho de SPE utilizado.

En base a estas observaciones se seleccionó **florisil** como cartucho de extracción, pues proporcionó las mejores respuestas para 5 de los compuestos estudiados, 3 de ellos con LMR establecido. Se fijó el **metanol** como **disolvente de elución** para posteriores ensayos puesto que así se evita trabajar con mezclas de disolventes y se prescinde del diclorometano, disolvente orgánico de toxicidad muy elevada.

2.2.3.1 Cantidad de muestra extraída

Fijadas las condiciones de compromiso en cuanto al adsorbente y al disolvente a utilizar para realizar la SPE, el siguiente parámetro a optimizar fue la cantidad de miel utilizada en los ensayos. Se compararon las recuperaciones obtenidas para cuatro extractos realizados con 1, 2, 5 y 10 gramos de muestra centrifugada. En todos los casos se llevó a cabo la extracción diluyendo la porción de miel con $MeOH:H_2O$ (20:80) en una proporción 1:3 (m/v) y se fortificó la muestra con 4 ng g^{-1} de todos los compuestos.

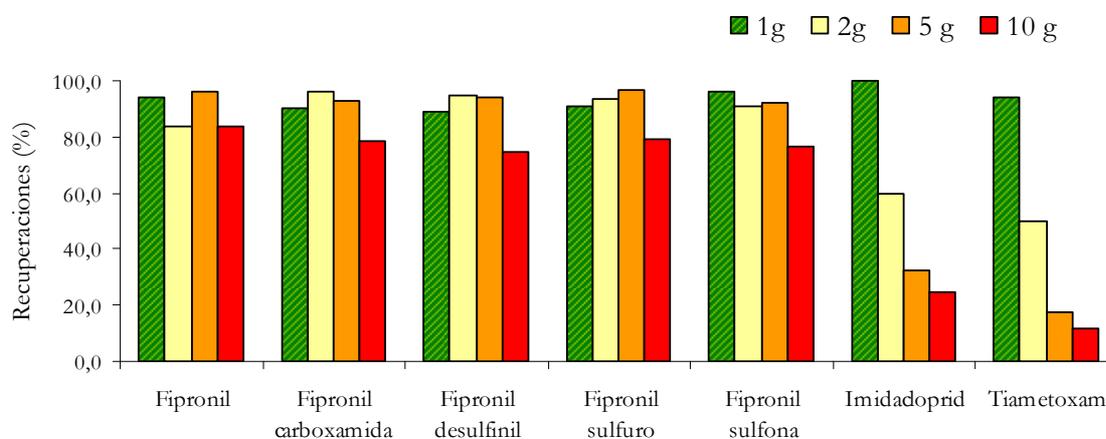


Figura IV.B.14. Variación de las recuperaciones obtenidas en función de la cantidad de muestra extraída.

Analizando la gráfica, se puede concluir que la utilización de grandes cantidades de muestra afecta negativamente a la eficiencia del proceso sobre todo para imidacloprid y tiametoxam. A la vista de las recuperaciones, lo más adecuado sería utilizar 2 gramos para los fenilpirazoles y 1 gramo para los dos neonicotinoides. Sin embargo para disminuir los posibles efectos de matriz en la fuente de ionización se decidió utilizar **un gramo de muestra**, puesto que para cualquiera de los casos expuestos en la gráfica anterior, estas condiciones (representadas por la barra verde en la gráfica) producen recuperaciones muy satisfactorias, sobre todo para fipronil y fipronil sulfona, ambos compuestos con LMR establecido en 10 ng g⁻¹.

2.2.3.2. Diseño experimental

Hay varios factores que pueden influir en la eficacia del método de extracción. Uno de ellos es la dilución de la muestra, que afecta a la matriz y su interacción con los analitos. Se evaluó el efecto del factor de dilución y de la proporción de disolventes utilizados en esta etapa del proceso.

Al igual que en el caso de la determinación de pesticidas en leche, se aplicó un diseño experimental de tipo Doehlert considerando como variables la **proporción de metanol en la mezcla MeOH:H₂O utilizada para diluir la muestra** y el **factor de dilución** de la misma.

El primero de los factores se estudió a 5 niveles y el segundo a 3, tal y como se muestra en la siguiente tabla:

Tabla IV.B.4. Variables estudiadas con el diseño experimental.

Factores estudiados	Niveles	Valores codificados
Proporción de MeOH:H ₂ O (v/v)	10:90	-1
	20:80	-0,5
	30:70	0
	40:60	0,5
	50:50	1
Factor de dilución	2	-0,866
	3	0
	4	0,866

Se genera un conjunto de experimentos ajustados a la siguiente matriz de experiencias establecida con los valores codificados de los niveles de cada factor:

Tabla IV.B.5. Matriz de experiencias del diseño experimental.

Experiencia	Valores codificados de los niveles de cada factor		Valores reales de los niveles de cada factor	
	Factor MeOH:H ₂ O	Factor dilución	Factor MeOH:H ₂ O	Factor dilución
1	0	0	30:70	3
2	0	0	30:70	3
3	0	0	30:70	3
4	-1	0	10:90	3
5	-0,5	0,866	20:80	4
6	1	0	50:50	3
7	0,5	-0,866	40:60	2
8	-0,5	-0,866	20:80	2
9	0,5	0,866	40:60	4

La realización de los experimentos bajo las condiciones especificadas por el diseño sobre una muestra de miel fortificada con los analitos a un nivel de 50 ng g⁻¹ para imidacloprid y 10 ng g⁻¹ para el resto de compuestos, proporcionó los resultados de recuperación que se muestran a continuación.

Tabla IV.B.6. Recuperaciones obtenidas para las experiencias del diseño.

	Experiencia								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Imidacloprid	77,9	81,0	79,7	95,4	98,0	8,1	67,9	95,5	25,4
Fipronil	71,6	71,9	73,5	86,9	92,6	10,7	66,9	86,3	25,4
Fipronil carboxamida	59,0	63,3	58,6	73,8	75,3	7,4	56,2	71,4	21,4
Fipronil desulfenil	71,2	72,9	74,5	91,5	94,7	11,9	69,9	93,4	28,6
Fipronil sulfona	65,7	67,8	67,6	83,5	87,4	10,9	63,4	82,0	24,0
Fipronil sulfuro	71,7	71,4	74,3	85,2	93,6	13,0	67,1	85,8	27,2
Tiametoxam	55,2	57,6	57,2	69,4	70,2	1,0	45,9	65,4	14,6

Las superficies de respuesta establecidas a partir de los resultados obtenidos describen una tendencia en las respuestas que se muestra a continuación para imidacloprid y fipronil.

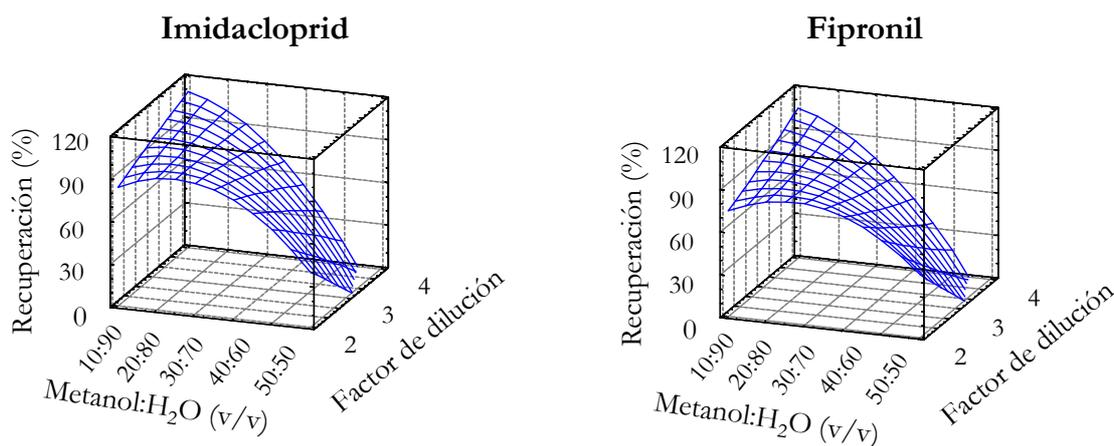


Figura IV.B.15. Superficies de respuesta para fipronil e imidacloprid obtenidas a partir del diseño experimental de Doehlert

En este caso, el tratamiento estadístico de los datos derivados del diseño experimental permitió determinar la **significación de ambos factores estudiados y de la interacción de los mismos**, según los modelos de regresión ajustados a un nivel de confianza del 99%. Las superficies de respuesta obtenidas para fipronil e imidacloprid muestran la variación que se

observa en las respuestas al aumentar la proporción de metanol en la mezcla de dilución, sobre todo para valores de dilución altos. Por su parte, a la vista de las superficies de respuesta, la dilución tiene un mayor efecto cuando la proporción de metanol en la mezcla es bajo.

Tras el cálculo de los óptimos teóricos para los 7 compuestos estudiados se decidió establecer las siguientes condiciones de compromiso para realizar la extracción.

Tabla IV.B.7. Condiciones de compromiso para la extracción de los 7 compuestos.

Cantidad de muestra (g)	1
Factor de dilución	4
MeOH:H ₂ O (v/v)	20:80

2.2.4 Evaluación del efecto matriz.

El efecto matriz fue evaluado por comparación de una recta de calibrado y otra de adición de matriz (“*matrix-matched standard*”) preparadas en fase móvil en el rango de concentraciones de 10 a 90 ng mL⁻¹ para imidacloprid y de 2 a 18 ng mL⁻¹ para el resto de los compuestos estudiados de acuerdo con los valores de LMR establecidos en el Reglamento 839/2008 de la Unión Europea, aplicables desde el 1 de Septiembre de 2008. El calibrado realizado por el método de la adición de matriz se preparó con un 40% de proporción de un extracto de miel sin fortificar para contar con el efecto de la matriz.

Tabla IV.B.8. Comparación de las pendientes de la recta de calibrado y de adición y estimación del % de supresión (-) o aumento (+) de señal para los compuestos estudiados.

	Recta de adición	Recta de calibrado	% supresión (-) o aumento (+) de la señal
Fipronil	154771	157961	-2,0
Fipronil carboxamida	25872	25272	2,4
Fipronil desulfinil	137177	140046	-2,0
Fipronil sulfuro	149871	161405	-7,1
Fipronil sulfona	272803	271677	0,4
Imidacloprid	59908	66837	-10,4
Tiametoxam	81550	92636	-12,0

Los valores de las pendientes de las rectas expuestos en la tabla anterior revelan que apenas existe efecto matriz para los compuestos determinados en negativo (fipronil y metabolitos) que presentan valores de supresión o aumento de señal en torno al 2% a excepción del metabolito sulfuro, para el cual se observa una supresión de señal del 7%. Por su parte, los dos compuestos nicotínicos (imidacloprid y tiametoxam) presentaron valores de supresión del 10,4 y 12,0%, respectivamente.

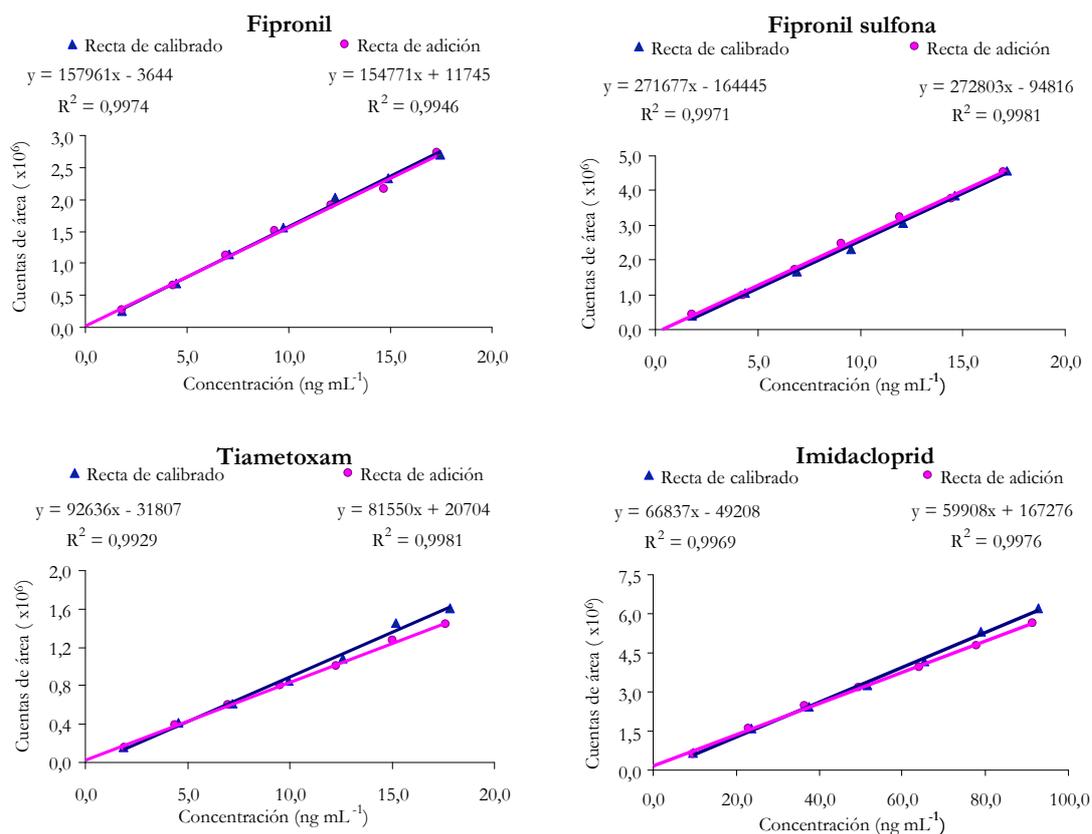


Figura IV.B.16. Rectas de adición de matriz y de calibrado para los compuestos que tienen LMR establecido.

Se muestra a continuación el cromatograma obtenido para el punto de calibrado, preparado según el método de “*matrix-matched standard*”, de concentración igual a los valores de LMR establecidos para aquellos compuestos legislados. Debido a que este el patrón de calibrado se preparó en base a un extracto blanco de la muestra, se pueden observar dos señales analíticas proporcionadas por la SRM correspondiente al subrogado. Una de ellas es el

imidacloprid-D4 y la otra es una interferencia presente en la muestra que produce una señal analítica con las mismas transiciones SRM determinadas para el imidacloprid-D4.

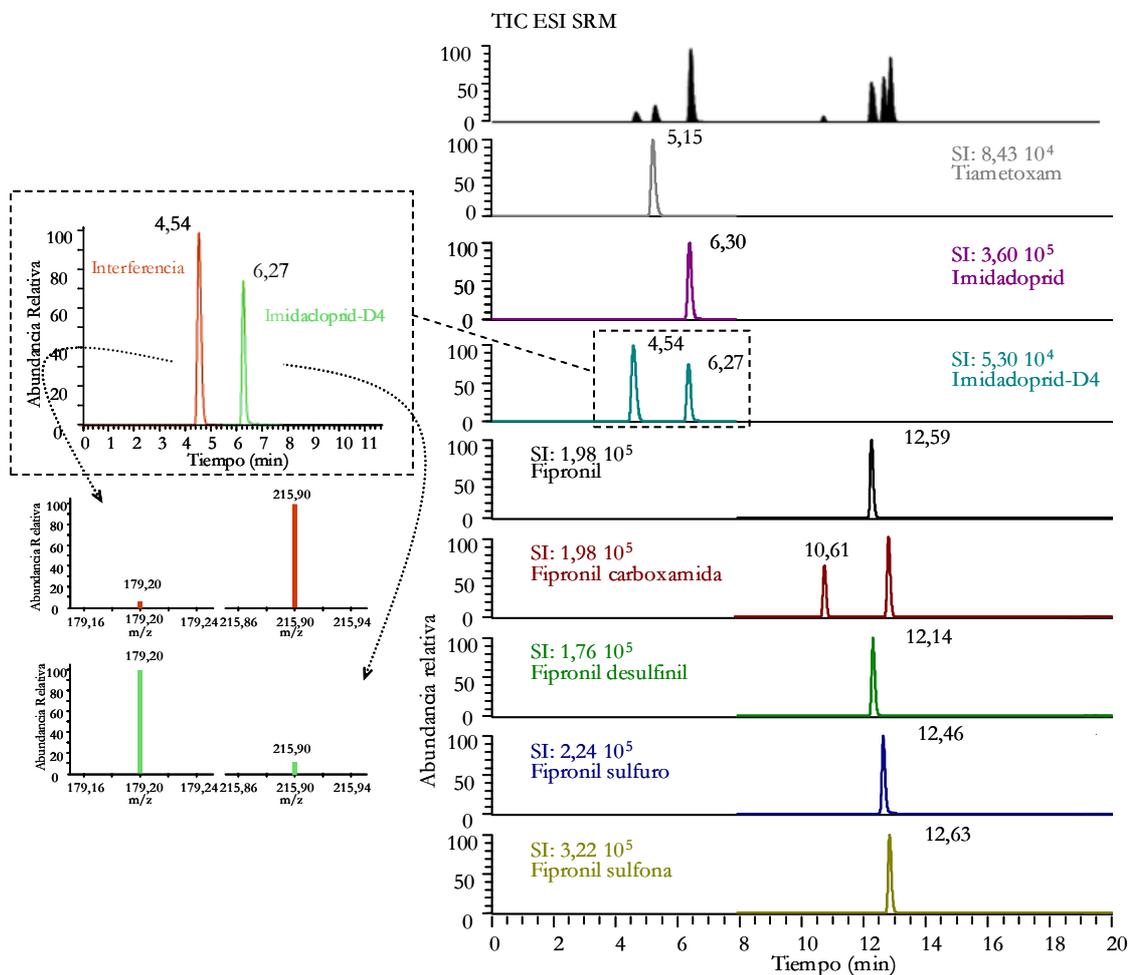


Figura IV.B.17. Cromatograma de un nivel de calibrado de la recta de adición (50 ng mL^{-1} para imidacloprid y 10 ng mL^{-1} para el resto) con ampliación de espectro de dos transiciones SRM de dos transiciones de dos señales.

Al comparar este cromatograma con uno de un punto de calibrado (figura IV.B.7), el tiempo de retención no deja duda acerca de cual es el analito de interés. Aun así la proporción de intensidades de las transiciones SRM, pondrá de manifiesto si se trata del compuesto esperado.

Como se puede ver en la gráfica, el imidacloprid-D4 (Tr: 6,27) presenta un espectro de MS² con señales cuyas intensidades guardan la relación esperada para este compuesto. Por otra parte, este espectro es completamente distinto al del otro pico registrado (Tr: 4,54). Por lo tanto se puede afirmar que se trata de una interferencia debida a la matriz que en nada afecta a la correcta cuantificación del subrogado.

Concluyendo con esta etapa de la puesta a punto del método y asumiendo que el efecto de la matriz sobre la señal es despreciable, las **calibraciones** para llevar a cabo la validación y la evaluación de presencia de residuos de pesticidas en muestras reales se realizarán utilizando el método de **calibración externa**, sin realizar ningún tipo de ajuste de matriz en los patrones preparados y **en ausencia de patrón interno**.

2.3. PARÁMETROS DE CALIDAD DEL MÉTODO

La Decisión 2002/657 de la Comisión Europea [34] describe el protocolo de actuación para proceder a la validación de métodos relacionados con matrices alimentarias. Siguiendo las directrices marcadas en este documento, se necesita realizar un gran número de determinaciones analíticas para evaluar los parámetros de calidad del método, lo que supone un gran consumo de tiempo y material.

Han surgido diversas estrategias alternativas que persiguen simplificar el proceso de validación del método cumpliendo con las especificaciones de la Decisión 2002/657/CE. La Dirección General de la Comisión Europea de Sanidad y Protección de los consumidores (SANCO) ha publicado el documento SANCO/10684/2009 (que sustituye el publicado anteriormente –SANCO/3131/2007– y entró en vigor el 12 de Enero del 2010), en donde se especifica cómo realizar la validación de métodos analíticos en el caso de análisis de residuos de pesticidas en matrices alimentarias.

Los parámetros de calidad del método (exactitud, precisión, repetibilidad, reproducibilidad, límite de decisión –CC α – y capacidad de detección –CC β –) se han determinado de forma simultánea, siguiendo la guía SANCO y un protocolo alternativo descrito por Loco y Beernaert [35], basado en la norma de calidad ISO 11843, que cumple con las especificaciones propuestas por la Decisión 2002/657/CE.

Para llevar a cabo la evaluación de la calidad del método, se ha analizado un grupo de **27 muestras de miel fortificadas** con los analitos a **concentraciones 0,5, 1 y 1,5 LMR**. Para aquellos compuestos que no tienen valor establecido de límite máximo de residuo se estableció una concentración arbitraria de 10 ng mL⁻¹ como valor de referencia para validar el método. La

determinación de todos los parámetros de calidad se hace de forma simultánea a partir de estas 27 determinaciones que se corresponden con la extracción por triplicado de cada uno de los niveles de concentración, proceso repetido tres veces en días distintos.

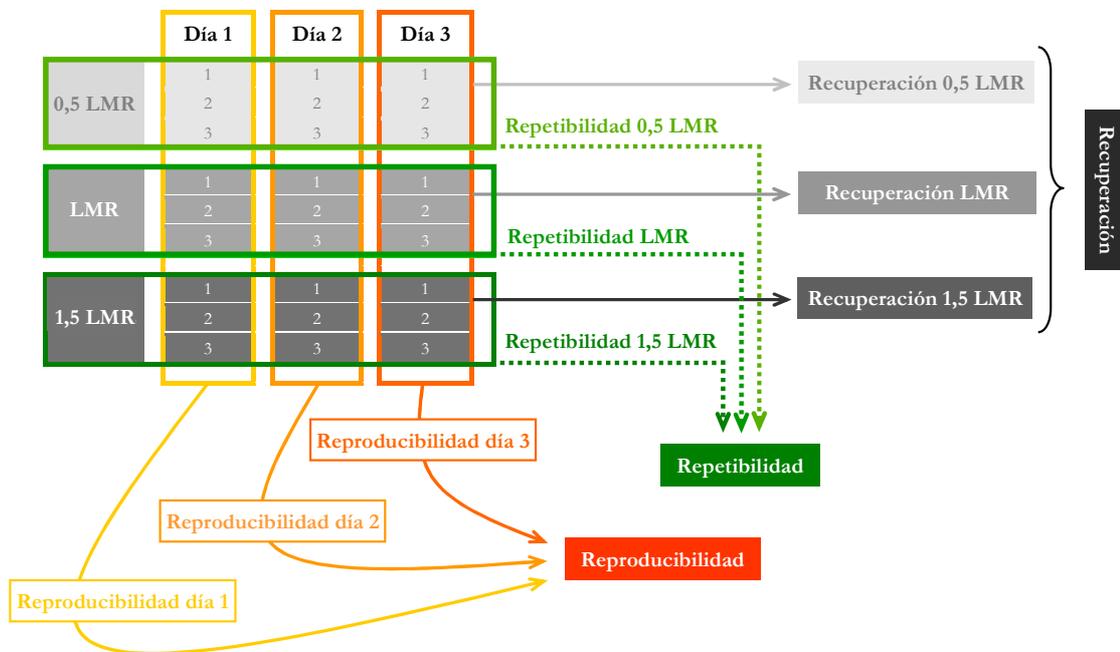


Figura IV.B.18. Esquema seguido para el cálculo de recuperación, reproducibilidad y repetibilidad a partir de los 27 extractos.

A continuación se detalla el cálculo de los parámetros de calidad del método desarrollado.

2.3.1 Linealidad.

Se ha considerado el estudio de linealidad de la calibración externa en un rango de 10 a 90 ng mL⁻¹ para el imidacloprid y de 2 a 18 ng mL⁻¹ para el resto de compuestos, con 5 rectas de calibrado independientes definidas por 7 niveles de concentración equidistantes, lo que significa 35 puntos de calibrado preparados de forma individual. Se ha seleccionado este rango de acuerdo con los LMRs establecidos para fipronil, fipronil sulfona, tiametoxam (10 ng g⁻¹) e imidacloprid (50 ng g⁻¹).

Se ha llevado a cabo un análisis estadístico de los datos aplicando el test F de Fisher y el test Q de Cochran a un nivel de confianza $\alpha=1\%$ para evaluar respectivamente la linealidad del modelo y la homogeneidad de las varianzas. Para todos los compuestos el test F proporcionó resultados satisfactorios por lo que el modelo resultó lineal en el rango de concentración estudiado. Por otra parte, el test Q delató la falta de homocedasticidad para fipronil carboxamida, imidacloprid e imidacloprid-D4, por lo que se procedió a evaluar la distribución de los residuales estandarizados para todos los puntos del calibrado de estos tres compuestos.

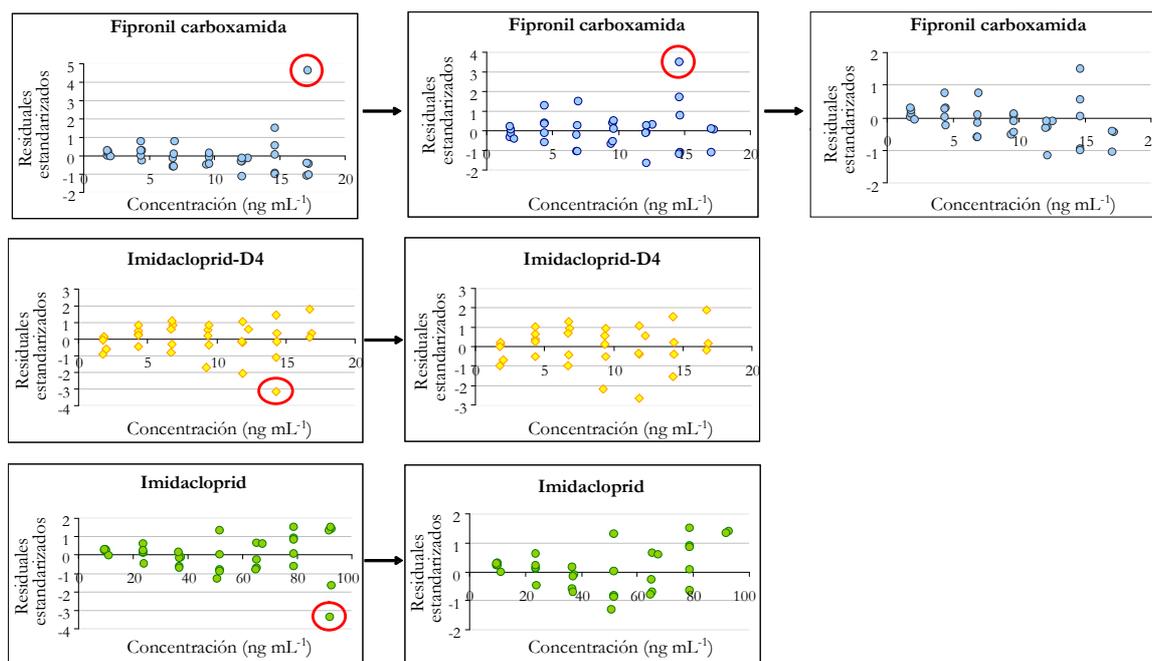


Figura IV.B.19. Gráficas de dispersión de residual estandarizado y corrección de *outliers*.

Para la mayoría de los niveles de calibrado, las replicas son bastante precisas (los valores están agrupados), y los residuales están en general bien distribuidos, lo cual es indicativo de la homocedasticidad de las varianzas. Aquellos residuales estandarizados que superen el valor de +/- 3 se consideran **aberrantes** puesto que el grado en que se desvían de un comportamiento homecedástico afecta al resultado del test F y se han excluido para llevar a cabo la regresión lineal del calibrado.

Es el caso de uno de los puntos del nivel alto para imidacloprid y fipronil carboxamida, y uno punto del nivel de concentración de 15 ng mL⁻¹ para imidacloprid-D4. En realidad, para el caso de imidacloprid y el subrogado, el punto se encuentra muy próximo al límite de -3, y solamente para el metabolito del fipronil el *outlier* está realmente alejado del valor central.

Como se puede observar, tras eliminar el punto aberrante, se logra una buena dispersión a excepción del fipronil carboxamida, para el cual aparece otro *outlier* para el nivel de concentración de 15 ng mL⁻¹. Prescindiendo de este punto, los residuales se distribuyen de una forma homogénea dentro del gráfico, a no ser a excepción del nivel alto del calibrado para este compuesto y para el imidacloprid, que presentan valores muy agrupados (por lo tanto una alta precisión) pero algo alejados del valor central del gráfico (es decir, con varianzas que difieren del resto de niveles).

Teniendo en cuenta la eliminación de estos cuatro puntos, las rectas de calibrado obtenidas quedan como se muestra a continuación.

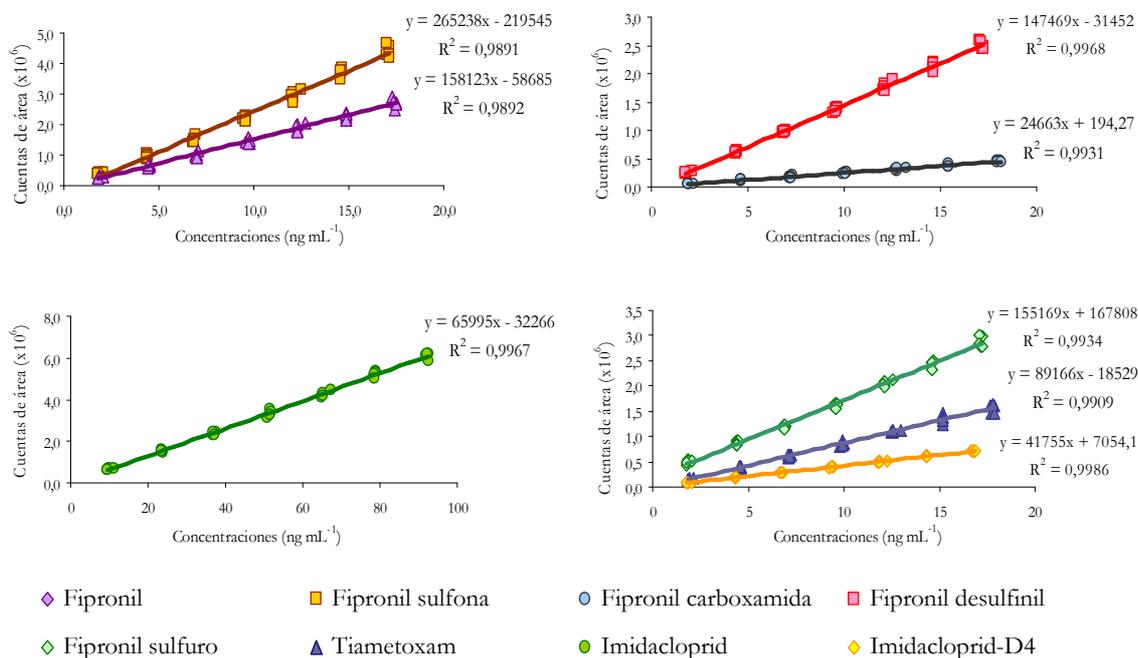


Figura IV.B.20. Rectas de calibrado obtenidas para los compuestos estudiados

Como se puede observar, tras efectuar la regresión lineal para cada compuesto, las curvas de calibrado obtenidas, teniendo en cuenta 33 puntos para fipronil carboxamida, 34 para imidacloprid e imidacloprid-D4 y 35 para cada uno de los compuestos restantes, se ajustan a una recta con valores de regresión comprendidos entre 0,9891 y 0,9986.

Finalmente la aplicación del test F y test Q (nivel de confianza $\alpha=1\%$) al conjunto de datos utilizados en la regresión (eliminando los *outliers*) denotan que la **metodología aplicada resulta lineal en el rango estudiado**.

2.3.2 Exactitud y precisión.

La **exactitud** asociada al procedimiento global de extracción y análisis ha sido estimada a teniendo en cuenta las 27 determinaciones realizadas para cada compuesto (3 niveles de concentración, por triplicado y repetido 3 días distintos).

Tabla IV.B.9. Valores de recuperación media y para cada nivel de fortificación.

Nivel de fortificación	0,5 LMR (%)	LMR (%)	1,5 LMR (%)	Recuperación (%)
Fipronil	97,8	95,3	94,1	95,7
Fipronil carboxamida	88,6	91,1	89,9	89,9
Fipronil desulfinil	99,2	91,6	88,8	93,2
Fipronil sulfuro	96,6	92,6	91,0	93,4
Fipronil sulfona	102,7	97,6	96,1	98,8
Imidacloprid	99,7	102,5	104,9	102,4
Tiametoxam	86,9	92,9	94,1	91,3

Por una parte se ha calculado la **recuperación** obtenida a partir de las 9 réplicas preparadas para cada nivel de fortificación (0,5; 1 y 1,5 veces el valor del LMR); de esta forma se deducen 3 estimaciones para cada compuesto. Mediante el promedio de éstas, se ha obtenido un único valor que se ha sido considerado como el dato final de recuperación deducido para cada pesticida estudiado. Al mismo tiempo se ha calculado la **desviación estándar relativa** de las determinaciones llevadas a cabo, con el resultado de valores que no superan el 5,8% con respecto a la media de las recuperaciones.

Esta baja dispersión es indicativa de la alta precisión de la metodología aplicada, que se verá confirmada al evaluar más a fondo los aspectos estadísticos de los datos manejados, en el siguiente punto en donde se evalúa la reproducibilidad y la repetibilidad asociada al método.

2.3.3. Repetibilidad y reproducibilidad.

La estimación de la **precisión** del método se realizó a partir de la evaluación de la repetibilidad y reproducibilidad. La decisión 2002/657/CE establece que estos parámetros han de ser evaluados a partir de análisis realizados en, al menos, 3 días distintos. Por esta razón se repitieron los extractos de miel fortificada a 3 niveles (cada uno por triplicado, es decir, 9 extractos) en tres días distintos.

La tabla de ANOVA derivada de aplicar un diseño factorial de un solo factor a los datos obtenidos, proporciona los valores de varianza a partir de los cuales se realiza el cálculo de la repetibilidad y reproducibilidad del método. La primera se evalúa en base a las 9 réplicas por cada nivel de fortificación (tres por cada día), mientras que la reproducibilidad se deduce

del análisis de varianza de los 3 replicados de cada nivel de fortificación de los análisis realizados en el mismo día.

Tabla IV.B.10. Estimación de la precisión del método analítico propuesto.

	Reproducibilidad (%)	Repetibilidad (%)
Fipronil	4,0	3,4
Fipronil desulfinil	4,3	3,7
Fipronil carboxamida	8,0	4,3
Fipronil sulfuro	5,2	3,5
Fipronil sulfona	5,3	3,3
Imidacloprid	5,7	3,3
Thiametoxam	3,1	3,9

Como se puede observar en la tabla, para cualquiera de los analitos estudiados los valores de repetibilidad y reproducibilidad no superaron el 8%, siendo en la mayoría de los casos cercanos al 4%, de lo cual se puede deducir que la metodología desarrollada ha resultado altamente precisa y robusta.

2.3.4 Límite de decisión ($CC\alpha$) y capacidad de detección ($CC\beta$).

En la Decisión 2000/657/CE se define **límite de decisión ($CC\alpha$)** como *el límite en el cual y a partir del cual se puede concluir con una probabilidad de error α que una muestra no es conforme*, entendiendo por “no conforme” que está realmente contaminada con los analitos de interés en una concentración calculable. Por otra parte, se define **capacidad de detección ($CC\beta$)** como *el contenido mínimo de la sustancia que puede ser detectado, identificado o cuantificado en una muestra, con una probabilidad de error β* . Por lo tanto representa *la concentración en la que un método puede detectar límites de concentración permitidos con una certeza estadística de $1 - \beta$* , cuando las sustancias presentan LMR. Si este no es el caso, entonces la capacidad de detección *es la concentración mínima en la que un método puede detectar muestras realmente contaminadas con una certeza estadística de $1 - \beta$* .

En este estudio se ha seguido la norma ISO 11843-2 en donde se definen las ecuaciones necesarias para realizar el cálculo de $CC\alpha$ y $CC\beta$. Para la evaluación del **límite de decisión**, se ha efectuado la regresión lineal de los resultados de los 27 análisis frente a las concentraciones de cada nivel de fortificación. La ecuación de la recta proporciona el valor de la pendiente y la ordenada con las cuales se puede calcular y_c o **el valor crítico de la variable de respuesta**, que representa *el valor de respuesta “y” que una vez excedido conduce, para una probabilidad de error α , a la conclusión de que el sistema observado no está en su estado básico*. Por lo tanto

y_c se corresponde con la señal analítica producida por la menor concentración que provoca un cambio de señal apreciable con respecto a la señal de fondo, es decir, es la señal esperada para una concentración x_c igual a $CC\alpha$ (valor crítico de la variable de estado).

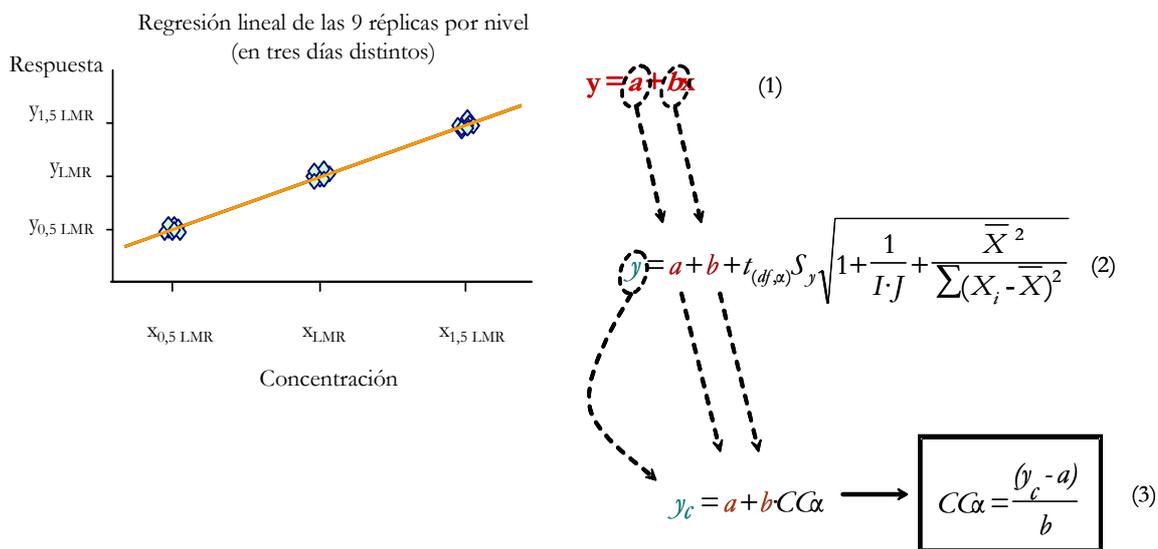


Figura IV.B.21. Deducción del cálculo de $CC\alpha$

A partir de los datos analíticos obtenidos de los 27 extractos de muestras fortificadas, se lleva a cabo una regresión lineal que proporciona la ecuación de la recta a la que se ajustan los datos (ecuación 1). En este momento se puede calcular el valor de y_c teniendo en cuenta:

- La regresión (ecuación 1) proporciona los valores de **a** y **b** (ordenada y pendiente)
- **t** de Student: 1,708 (25 grados de libertad y una probabilidad del 1%),
- el error absoluto medio (S_y),
- el número de niveles de fortificación (**J**=3)
- el número de réplicas por nivel de concentración (**I**=9)

A partir del valor de y_c , se calcula $CC\alpha$ siguiendo la ecuación 3. El cálculo de $CC\beta$ se lleva a cabo de un modo iterativo, buscando el valor de concentración que, sustituido en la ecuación 4, proporcione una respuesta igual a y_c .

$$y = a + bX_{CC\beta} + t_{(df,\beta)} S_y \sqrt{1 + \frac{1}{I \cdot J} + \frac{(X_{CC\beta} - \bar{X})^2}{\sum (X_i - \bar{X})^2}} \quad (4)$$

De la aplicación de estas fórmulas matemáticas se obtienen los valores para $CC\alpha$ y $CC\beta$, que se muestran en la siguiente tabla y que resultan claramente en concordancia con los LMRs dispuestos para 4 de los analitos estudiados.

Tabla IV.B.11. Valores de límite de decisión y capacidad de detección

	$CC\alpha$ (ng g ⁻¹)	$CC\beta$ (ng g ⁻¹)	LMR (ng g ⁻¹)
Fipronil	0,45	0,89	10*
Fipronil carboxamida	0,48	0,96	
Fipronil desulfinil	0,58	1,16	
Fipronil sulfuro	0,41	0,83	
Fipronil sulfona	0,43	0,85	10*
Imidacloprid	2,33	4,63	50*
Tiametoxam	0,51	1,00	10

* suma de fipronil y fipronil sulfona expresado como LMR para fipronil

A tenor de los resultados obtenidos se puede afirmar que el método propuesto presenta una alta sensibilidad con valores de límite de decisión y capacidad de detección comprendidos entre 0,41 y 2,33 para $CC\alpha$ y 0,83 y 4,63 para $CC\beta$, lo cual significa valores inferiores a los LMRs establecidos para fipronil y fipronil sulfona, tiametoxam e imidacloprid.

2.4. APLICACIÓN AL ESTUDIO DE MUESTRAS DE MIEL DE APIARIOS DE GALICIA

Conociendo la compleja naturaleza de los panales en donde las abejas generan y almacenan la miel, se puede hacer una idea de lo complicado que resulta este primer paso de toma de muestra.

Las construcciones artificiales donde las abejas desarrollan su actividad están formadas por varias láminas acopladas en sentido vertical u horizontal en donde se construye el

entramado de celdas de **cera** y **propóleo** que contendrán la **miel**, las **larvas** y el **polen**. Estos componentes están distribuidos de una forma ordenada dentro del panal de manera que las celdas ocupadas con larvas se sitúan entre las más internas, que contienen el polen (fuente de proteínas), y las que contienen la miel (soporte energético), que ocupa el puesto más externo dentro del panal [20,22].

Por lo tanto, en el proceso de **muestreo**, en realidad se recoge una **porción del panal** que implica una parte de larvas, otra de polen y en su gran mayoría celdas que contienen miel. Resulta fácil comprender que la proporción de cada componente difiere mucho de una muestra a otra, aunque al ser la miel un producto tan viscoso, siempre está presente en las muestras analizadas.



Figura IV.B.22. Cinco muestras representativas de las recibidas en el laboratorio

2.4.1. Preparación de la muestra.

La extracción de la miel de las celdas es un proceso relativamente sencillo, puesto que tras aplicar una centrifugación se separa del resto de componentes que se amalgaman en la parte superior del tubo (en la figura IV.B.23, “residuo”). No ocurre lo mismo con el polen, que ha de ser extraído de las celdillas con ayuda de una espátula, lo cual dificulta enormemente su estudio.

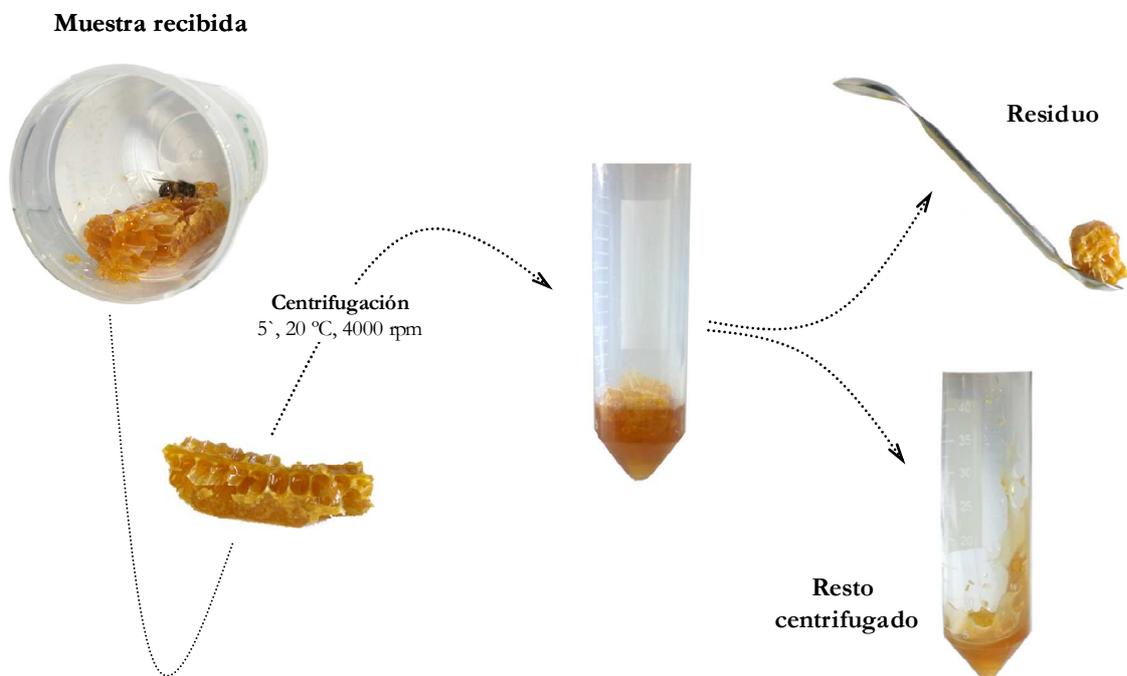


Figura IV.B.23. Procedimiento de separación de la fracción “extraíble”.

Por esta razón se ha planteado el análisis de las muestras recibidas como “un todo”, aplicando el procedimiento de extracción a la **fracción inferior que se obtiene tras la centrifugación** (en la figura IV.B.23, “resto centrifugado”). Ésta en realidad es una mezcla de miel, con una baja presencia de polen y cera. Dado que la cantidad de muestra analizada es muy pequeña, la separación de los restos sólidos de polen, ceras y larvas que se recogen en la parte superior de la miel centrifugada no impiden obtener la cantidad de muestra necesaria para llevar a cabo los análisis.

2.4.2. Análisis de muestras reales.

El método propuesto de SPE de una muestra diluida se aplicó sobre **91 muestras de porciones de panales recogidos en 73 apiarios del norte de Galicia**, recogidas bajo un programa de muestreo en dos etapas durante el año 2008. Se llevó a cabo un seguimiento de la eficiencia del proceso, añadiendo como subrogado imidacloprid-D4 a las muestras una vez centrifugadas, antes de proceder a aplicar la metodología descrita en el apartado 1.3 de este capítulo (ilustrado en la figura IV.B.3).

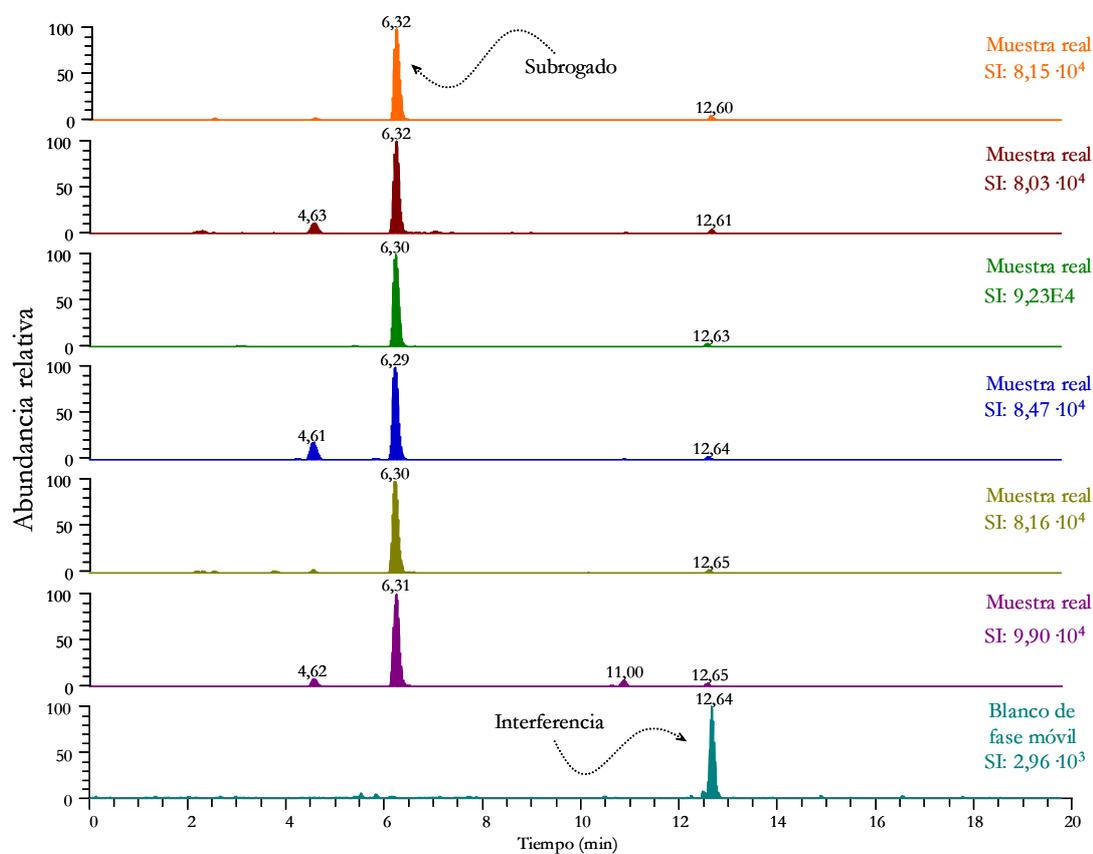


Figura IV.B.24. Cromatograma obtenido para un blanco de fase móvil y cinco muestras recibidas en el laboratorio, extraídas según el protocolo descrito y validado.

El análisis por LC-MS/MS reveló que **no se detectaron residuos por encima del nivel de concentración de CC α** para ninguno de los compuestos objeto de estudio. La recuperación media para el subrogado fue de 104,5 % con una desviación estándar relativa de 11,3%.

Como se puede observar en la siguiente figura, el blanco de fase móvil muestra una señal a 12,64 minutos, que coincide con el tiempo de retención del fipronil sulfona, y que produce un pico con la misma transición que éste.

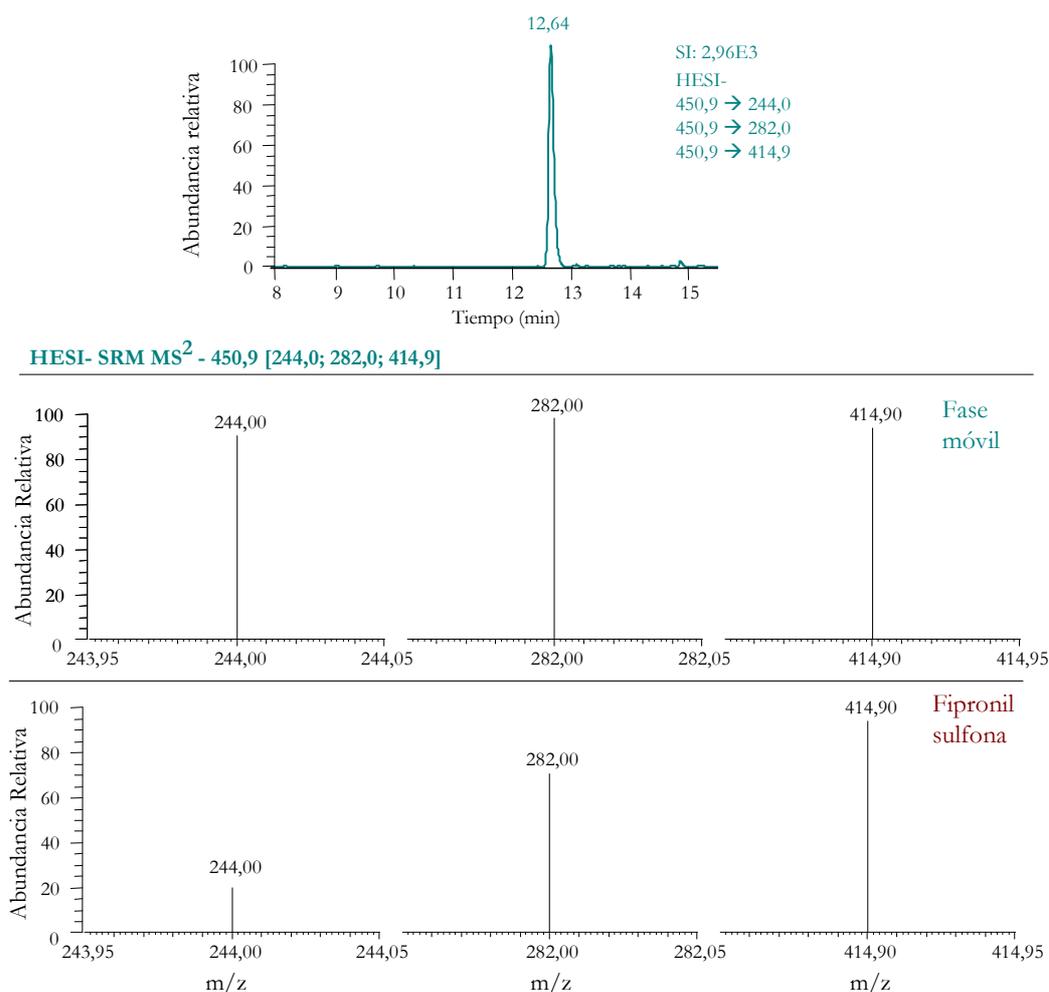


Figura IV.B.25. Comparación de los espectros de SRM correspondientes a la interferencia de la fase móvil y del fipronil sulfona para la SRM de este compuesto.

Se puede extraer por tanto como conclusión que **no existe presencia de residuos de imidacloprid, tiametoxam o fipronil (ni de sus metabolitos) en las muestras analizadas**, que se recogieron en un muestreo realizado teniendo en cuenta todo el censo apícola oficial de Galicia del año 2008.

Enfocando el estudio **desde un punto de vista epidemiológico**, además del analítico, se puede afirmar que, en estos casos, los pesticidas no parecen ser la causa final del despoblamiento de las colmenas en nuestra comunidad autónoma. Un informe emitido por Tragega en donde se recogen todas las analíticas aplicadas sobre estas muestras, así como el análisis estadístico de los datos obtenidos efectuado por Jesús Moreno González (Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo), han puesto de manifiesto que en contadas ocasiones se determinó clorpirifós, clorfenvinfós y fluvinato en muestras de polen, aunque, tal y como se concluye en el documento, la presencia de residuos de estos pesticidas en polen fue anecdótica y no se les atribuye la existencia de colmenas afectadas por el Síndrome de despoblamiento **[36]**.

3. BIBLIOGRAFÍA

[1] Casida, J.; Pest Toxicology: The Primary Mechanisms of Pesticide Action; *Chem. Res. Toxicol.*; 22, **2009**, pp. 609-619.

[2] Iwasa, T.; Motoyama, N.; Ambrose, J.; Roe, R.; Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*; *Crop Prot.*; 23, **2004**, pp. 371-378.

[3] Porrini, C.; Sabatini, A.; Girotti, S.; Ghini, S.; Medrzycki, P.; Grillenzoni, F.; Bortolotti, L.; Gattavecchia, E.; Celli, G.; Honey bees and bee products as monitors of the environmental contamination; *Apiacta*; 38, **2003**, pp. 63-70.

[4] Colin, M.; Bonmatin, J.; Moineau, I.; Gaimon, C.; Brun, S.; Vermandere, J.; Method to Quantify and Analyze the Foraging Activity of Honey Bees: Relevance to the Sublethal Effects Induced by Systemic Insecticides; *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*; 47, **2004**, pp. 387-395.

[5] Bacci, M.; Síndrome de despoblamiento de colmenas; Programa de Control de Enfermedades de las Abejas. *SENASA*. 2007.

[6] *Honey bee diseases and pests: a practical guide*. En “Agricultural and food engineering technical report”; *Food And Agriculture Organization Of The United Nations - FAO*, Roma **2006**

[7] Beekman, M.; Ratnieks, W.; Long-range foraging by the honey-bee, *Apis mellifera* L.; *Funct. Ecol.*; 14, **2000**, pp. 490-496.

[8] Bonmatin, J.; Charvet, R.; Colin, M.; Fleche, C.; *Behaviour of imidacloprid in fields. toxicity for honey bees*. En “Environmental Chemistry: Green Chemistry and Pollutants in Ecosystems”; Lichtfouse, E.; Schwarzbauer, J.; Robert, D.; Ed. Springer (Berlín, Alemania), **2005**, pp. 483-494

[9] El-Hassani, A.; Dacher, M.; Gauthier, M.; Armengaud, C.; Effects of sublethal doses of fipronil on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*); *Pharmacol. Biochem. Behav.*; 82, **2005**, pp. 30-39.

[10] Sánchez-Brunete, C.; Miguel, E.; Albero, B.; Tadeo, J.; Determination of fipronil residues in honey and pollen by gas chromatography; *Span. J. Agric. Res.*; 6, **2008**, pp. 7-14.

[11] Jiménez, J.; Bernal, J.; del Nozal, M.; Martín, M.; Mayo, R.; Comparative study of sample preparation procedures to determine fipronil in pollen by gas chromatography with mass spectrometric and electron-capture detection; *J. Chromatogr. A*; 1146, **2007**, pp. 8-16.

[12] Rossi, S.; Sabatini, A.; Cenciarini, R.; Ghini, S.; Girotti, S.; Use of High-Performance Liquid Chromatography-UV and Gas Chromatography-Mass Spectrometry for Determination of the Imidacloprid Content of Honeybees, Pollen, Paper Filters, Grass, and Flowers; *Chromatographia*; 61, **2005**, pp. 189-195.

[13] Walorczyk, S.; Gnusowski, B.; Development and validation of a multi-residue method for the determination of pesticides in honeybees using acetonitrile-based extraction and gas chromatography–tandem quadrupole mass spectrometry; *J. Chromatogr. A*; 1216, **2009**, pp. 522-531.

[14] Pirard, C.; Widart, J.; Nguyen, B.; Deleuze, C.; Heudt, L.; Haubruge, E.; De Pauw, E.; Focant, J.; Development and validation of a multi-residue method for pesticide determination in honey using on-column liquid–liquid extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry; *J. Chromatogr. A*; 1152, **2007**, pp. 116-123.

[15] Totti, S.; Fernandez, M.; Ghini, S.; Picó, Y.; Fini, F.; Mañes, J.; Girotti, S.; Application of matrix solid phase dispersion to the determination of imidacloprid, carbaryl, aldicarb, and their main metabolites in honeybees by liquid chromatography–mass spectrometry detection; *Talanta*; 69, **2006**, pp. 724-729.

[16] Morzycka, B.; Simple method for the determination of trace levels of pesticides in honeybees using matrix solid-phase dispersion and gas chromatography; *J. Chromatogr. A*; 982, **2002**, pp. 267-273.

[17] Albero, B.; Sanchez-Brunete, C.; Tadeo, J.; Analysis of Pesticides in Honey by Solid-Phase Extraction and Gas Chromatography-Mass Spectrometry; *J. Agric Food*; 52, **2004**, pp. 5828-5835.

[18] Rancan, M.; Rosi, S.; Sabatini, G.; Determination of Thiamethoxam residues in honeybees by high performance liquid chromatography with an electrochemical detector and post-column photochemical reactor; *J. Chromatogr. A*; 1123, **2006**, pp. 60-65

[19] De Pinho, G.; Neves, A.; Lopes, M.; Oliveir, F.; Optimization of the liquid–liquid extraction method and low temperature purification (LLE–LTP) for pesticide residue analysis in honey samples by gas chromatography; *Food Control*; En proceso de impresión (Consulta on-line: 30-04-2010)

[20] Jiménez, J.; Bernal, J.; del Nozal, M.; Martín, M.; Mayo, R; Sample preparation methods to analyze fipronil in honey by gas chromatography with electron-capture and mass spectrometric detection; *J. Chromatogr. A* **1187** (2008), pp. 40-45.

[21] Lambropoulou, D.; Albanis, T.; Quantitative identification of pesticides as target compounds and unknowns by spectral deconvolution of gas chromatographic/mass spectrometric data; *Anal. Bioanal. Chem.*; 389, **2007**, pp. 1663-1683.

[22] Kujawski M.; Namieśnik, J.; Challenges in preparing honey samples for chromatographic determination of contaminants and trace residues; *Trends Anal. Chem.*; 27, **2008**, pp. 785-793.

[23] Zhen, J; Zhuguang; L; Meiyu; C; Yu, M.; Jun, T.; Yulan, F.; Jiachen, W.; Zhaobin, C.; Fengzhang, T.; Determination of Multiple Pesticide Residues in Honey Using Gas Chromatography-Electron Impact Ionization-Mass Spectrometry; *Chin. J. Chromatogr.*; 24, **2006**, pp. 440-447.

[24] Rial-Otero, R.; Gaspar, E.; Moura, I.; Capelo, J.; Chromatographic based methods for pesticide determination in honey: An overview; *Talanta*; 71, **2007**, pp. 503-514.

[25] Kadar, A.; Faucon, J.; Determination of traces of fipronil and its metabolites in pollen by liquid chromatography with electrospray ionization-tandem mass spectrometry; *J. Agric. Food Chem.*; 54, **2006**, pp. 9741-9746

[26] Rissato, S.; Galhiane, M.; de Almeida, M.; Gerenutti, M.; Apon, B.; Multiresidue determination of pesticides in honey samples by gas chromatography–mass spectrometry and application in environmental contamination; *Food Chem.*; 101, **2007**, pp. 1719-1726.

[27] Blasco, C.; Fernández, M.; Picó, Y.; Font, G.; Comparison of solid-phase microextraction and stir bar sorptive extraction for determining six organophosphorus insecticides in honey by liquid chromatography–mass spectrometry; *J. Chromatogr. A*; 1030, **2004**, pp. 77-85.

[28] Erdoğan, Ö.; Levels of selected pesticides in honey samples from Kahramanmaraş, Turkey; *Food Control*, **18** (2007), pp. 866-871

[29] Rezić, I.; Horvat, A.; Babić, S.; Kaštelan-Macan M.; Determination of pesticides in honey by ultrasonic solvent extraction and thin-layer chromatography; *Ultra. Sonochem.*; 12, **2005**, pp. 477-481.

[30] Jiménez, J.; Bernal, J; del Nozal, J; Toribio, L.; Martín, T.; Gas chromatography with electron-capture and nitrogen–phosphorus detection in the analysis of pesticides in honey

after elution from a Florisil column: Influence of the honey matrix on the quantitative results; *J. Chromatogr. A*; 823, **1998**, pp 381-387.

[31] Jiménez, J.; Bernal, J.; del Nozal, M.; Martín, M.; Mayorga, A.; Solid-phase microextraction applied to the analysis of pesticide residues in honey using gas chromatography with electron-capture detection; *J. Chromatogr. A*, 829, **1998**, pp 269-277

[32] **Council Directive 96/23/EC** of 29 April 1996 on measures to monitor certain substances, residues thereof in live animals, animal products, repealing Directives 85/358/EEC, 86/469/EEC, Decisions 89/187/EEC, 91/664/EEC.

[33] **Commission Decision 97/747/EC** of 27 October 1997 fixing the levels, frequencies of sampling provided for by Council Directive 96/23/EC for the monitoring of certain substances, residues thereof in certain animal products; *Off. J. Eur. Comm.*, L 303, **1997**

[34] **Commission Decision 2002/657/EC** of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods, the interpretation of results; *Off. J. Eur. Comm.*, L 221, 2002, 8 – 36.

[35] J. Loco, H. Beernaert, *Proceedings of Euro Food Chem XII: Strategies for safe food*. Brugge. Belgium, 91, **2003**.

[36] “Estudio epidemiológico sobre los factores de riesgo que afectan a la pérdida de colmenas en la comunidad autónoma de Galicia”. *Grupo Tragsega*, **2010**.

IV.C. DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE PESTICIDAS EN MUESTRAS DE AGUA DE RÍO.

El estudio realizado forma parte de dos proyectos de investigación; el primero de ellos, que lleva por título ***“Evaluación de la presencia de residuos de pesticidas en aguas y suelos agrícolas de explotaciones ganaderas en Galicia”***, fue financiado por el INIA (Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria) en el año 2007. El segundo de los proyectos, financiado por la Xunta de Galicia (2006-2009) lleva por título ***“Implementación de un sistema de información geográfico (sig) para la evaluación de la contaminación de las aguas por la actividad agraria en cuencas hidrográficas”***.

Parte de las investigaciones realizadas en este campo están recogidas en el artículo ***“Study of the presence of priority pesticides in surface water of river basins located in two areas of intensive dairy farming in the NW Spain (Galicia)”*** (*pendiente de envío*), cuyo resumen se incluye en los Anexos finales de esta Memoria de Tesis.

1. PARTE EXPERIMENTAL.	- 216 -
1.1. PATRONES EMPLEADOS. PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES. ..	- 216 -
1.2. DESCRIPCIÓN DE LAS ÁREAS Y FRECUENCIAS DE MUESTREO.	- 217 -
1.2.1. Fortificación de las muestras.	- 219 -
1.3. PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN: SPE.	- 219 -
1.4. DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN.	- 221 -
2. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.	- 223 -
2.1. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS. ..	- 223 -
2.2. PRUEBAS PREVIAS.	- 227 -
2.2.1. Selección del cartucho utilizado.	- 227 -
2.2. PARÁMETROS DE CALIDAD DEL MÉTODO.	- 229 -
2.2.1. Linealidad.	- 229 -
2.2.2. Exactitud y precisión.	- 230 -
2.2.4. LODs y LOQs.....	- 232 -
2.3. ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LOS RESULTADOS EN AGUAS SUPERFICIALES.	- 235 -
2.3.1. Residuos de pesticidas encontrados en aguas superficiales de la cuenca del Xallas.....	- 236 -
2.3.2. Concentración total de pesticidas para la cuenca del Xallas.	- 240 -
2.3.3. Residuos de pesticidas encontrados en aguas superficiales de la cuenca del alto Miño.	- 241 -
2.3.4. Concentración total de pesticidas para la cuenca del alto Miño.....	- 244 -
2.3.3. Evaluación de las concentraciones medias anuales.....	- 245 -
2.3.3.1. Cuenca del río Xallas	- 245 -
2.3.3.1. Cuenca del río Miño.....	- 247 -
2.3.4. Variación en la concentración estimada de sustancias prioritarias.....	- 248 -
2.4. EVALUACIÓN DE LA INFORMACIÓN DERIVADA DEL ESTUDIO.	- 249 -

3. BIBLIOGRAFÍA..... - 252 -

En una primera aproximación que persigue evaluar la contaminación derivada de las prácticas agrícolas, se llevó a cabo la **monitorización de 54 pesticidas** (7 de ellos incluidos entre los 10 pertenecientes a la lista de contaminantes prioritarios en aguas) durante un período de dos años.

Una encuesta realizada en 2006 en más de 450 explotaciones gallegas reflejó que los herbicidas más utilizados sobre cultivos de maíz eran atrazina (41%), alacloro (36%), sulcotriona (27%) y acetocloro (17%), y los insecticidas clorpirifós (30%), cipermetrina (9%), fenitrotión (4%) y deltametrina (3%).

Las muestras de **agua superficial** han sido estudiadas en multitud de ocasiones debido a que este medio representa una importantísima vía de distribución de sustancias contaminantes y además puede resultar indicativo de la contaminación de otros compartimentos medioambientales. Además, desde la entrada en vigor de la DMA, muchos trabajos de investigación de todo el territorio que comprende la Comunidad Europea se han centrado en la evaluación del estado de contaminación de los ríos según las normas de calidad ambiental [3 - 7].

El objetivo de este trabajo no es tanto optimizar las condiciones analíticas de un método para la determinación de residuos en este tipo de matriz, sino más bien **evaluar el estado de las aguas de los ríos** seleccionados para el análisis y seguir su evolución para poder trazar, si lo hubiera, un **patrón de comportamiento** en función de las prácticas agrícolas desarrolladas. Se trata de evaluar el impacto por contaminación difusa: qué tipos de pesticidas alcanzan las aguas superficiales y cómo varía la presencia de los mismos en el río en función de la época de tratamiento del cultivo (postsiembr, presiembr...).

Ningún otro proyecto se ha dedicado al **estudio del impacto que pueden generar las prácticas agrícolas relativas al ganadería de bovino, sobre la calidad de aguas superficiales en Galicia**. Asumiendo que es precisamente éste el aspecto más interesante y novedoso del trabajo desarrollado en esta parte de la Tesis, y tratándose de muestras de agua de río sin ninguna particularidad especial, se ha adoptado una metodología analítica en base a la bibliografía consultada y a la experiencia propia, sin focalizar el trabajo en la optimización del método de extracción y de análisis.

El estudio bibliográfico revela que la técnica más utilizada para analizar este tipo de muestras es la SPE, procesando grandes volúmenes de agua (generalmente entre 200 y 1000 mL), con cartuchos de distintos empaquetados en función de los compuestos estudiados [8 - 16]. La utilización de esta técnica de preparación de muestra está avalada por la EPA, que ha propuesto un método oficial basado en la SPE para el análisis de muestras de agua utilizando cartuchos de C₁₈ para el caso de compuestos lipofílicos y empaquetados formados a base de

copolímeros para compuestos de polaridad intermedia/alta. [17]. El uso de estos cartuchos resulta bastante común puesto que dado que cubren un amplio rango de polaridades, permiten el desarrollo de métodos multiresiduo que proporcionan resultados satisfactorios en la extracción de multitud de compuestos [12 - 16]. Este es el caso de los cartuchos OasisTMHLB, utilizados en este trabajo, que presentan un empaquetado copolimérico formado por dos monómeros: divinilbenzeno y N-vinilpirrolidona. El primero retiene compuestos apolares mientras que el segundo tiene afinidad por compuestos de carácter hidrofílico con polaridad intermedia [18].

1. PARTE EXPERIMENTAL.

1.1. PATRONES EMPLEADOS. PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES.

Se han estudiado los siguientes compuestos.

Tabla IV.C.1. Compuestos determinados en las cuencas del río Xallas y del río Miño.

Organofosforados	Clorfenvinfós Clorpirifós Fenitrotión Fosalona Metil pirimifós Mevinfós Triazofós	Ureas sustituidas	Bromacil Cloroxurón Dimeturón Diurón Etidimurón Isoproturón Linurón Lufenurón Metabromurón Metabenztiaturón Metoxurón Monolinurón	Triazinas y metabolitos	Atrazina Cianazina DEA DETBA DIA Metamitrona Prometrina Propazina Simazina Terbutrina Terbutilazina
Acetamidas	Acetocloro Alacloro Carbetamida Metazacloro Metolacloro Dimetenamida-P		Herbicidas ácidos		2,4-D Diclorprop Fluazifop Fluroxipir Haloxifop MCPA Mecoprop
Nitrilo	Bromoxinil Ioxinil				

La estructura, propiedades y otros datos útiles acerca de estos pesticidas se pueden consultar en los anexos de esta Tesis.

Al igual que para el trabajo desarrollado para la matriz de leche (expuesto en el apartado A del presente capítulo), el hecho de analizar 54 analitos con el mismo método multiresiduo obliga a trabajar con mezclas de compuestos. Se ha utilizado la mezcla NE-7500 (ureas a excepción de lufenurón, triazinas, carbetamida, metazacloro, cloridazón, etofumesato y triadimefón), NE-7555 (organofosforados a excepción del metil pirimifós), NE-2530 (herbicidas ácidos, bentazona, dinoterb, sulcotriona, bromoxinil e ioxinil) y patrones individuales de acetocloro, alacloro, fipronil, imidacloprid metil pirimifós, dimetenamida-P,

metalaxil y lufenurón). Como subrogado se ha añadido [$^2\text{H}_3$]-Atrazina a las muestras para su posterior análisis en modo de ionización positivo, mientras que para las determinaciones en negativo se ha utilizado [$^2\text{H}_3$]-Mecoprop. Las soluciones de trabajo se han preparado en su totalidad en metanol a partir de sucesivas diluciones de las soluciones madre, para formar una mezcla de todos los compuestos a una concentración de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$.

1.2. DESCRIPCIÓN DE LAS ÁREAS Y FRECUENCIAS DE MUESTREO.

La clasificación de las cuencas se realizó en base al **sistema de ordenación de corrientes y cuencas de Strahler** que define la forma de ramificar el río en cualquier cuenca hidrográfica: ríos de primer orden son los que no tienen afluentes; los de segundo orden se forman al unirse los de primer orden; los de tercer orden se forman al unirse los de segundo y así sucesivamente. De esta forma, a raíz de las diferentes ramificaciones, según el orden que presente el tramo, se determinan las muestras que se deben de tomar en cada caso. [19].

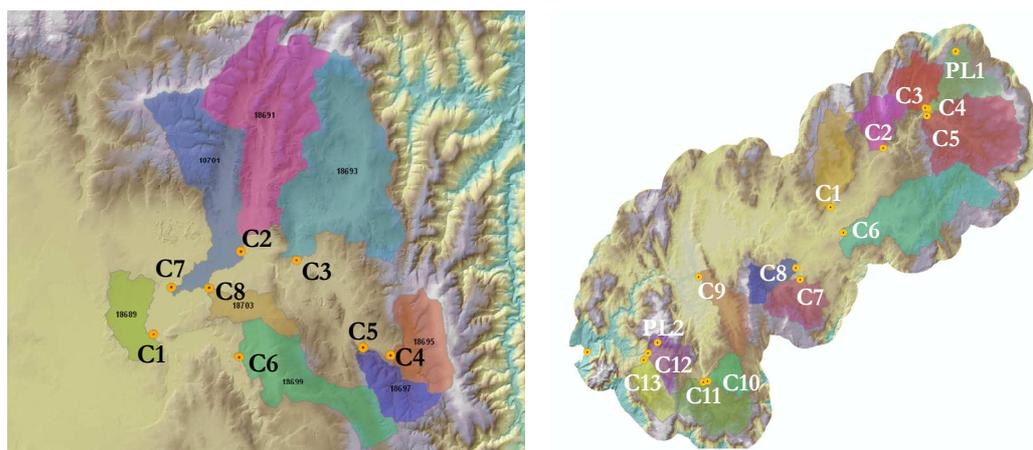


Figura IV.C.1. Mapeado del muestreo en las cuencas del alto Miño (izquierda) y Xallas (derecha).

De acuerdo con el sistema propuesto, en el caso del río Xallas, se han recogido muestras en 13 puntos, identificados por C01 a C13; además se han tomado muestras en dos subcuencas que se han denominado “puntos limpios” puesto que no se espera obtener ningún resultado positivo de existencia de residuos debido a la escasa actividad agrícola en las

inmediaciones de las mismas. Estas muestras se reconocen por XPL1 y XPL2. En cuanto al río Miño, el procedimiento ha sido el mismo, obteniendo en este caso 8 muestras de C1 a C8. En todos los casos fueron ríos de tercer orden según la clasificación de Strahler.

La frecuencia del muestreo fue de carácter mensual para el río Xallas a excepción del período comprendido entre Mayo y Julio de 2008, meses durante los cuales el muestreo se hizo cada 15 días. En cuanto al río Miño, el muestreo fue trimestral a excepción de los meses de Mayo a Junio de 2008, en los que se tomó una muestra cada mes. Las muestras se almacenaron en botellas de vidrio ámbar que se guardaron inmediatamente en frío durante el muestreo y en nevera a 4°C en los días posteriores. La normativa vigente indica que el análisis debe realizarse en las 48 horas posteriores al muestreo debido a la degradación que sufren los compuestos, por lo que la extracción de los analitos se efectuó el mismo día de la recepción de las muestras o al día siguiente.

Las cuencas estudiadas en estos dos ríos ocupan una extensión de 24735 Ha para Xallas y 19294 Ha para Miño. En ambos casos la proporción de área cultivada de maíz fue de 15% y la densidad media de ganado bovino se estimó en 0,54 y 0,83 animales/Ha respectivamente.

Tal y como muestra la siguiente gráfica, existe una cierta correlación entre la densidad de ganado por Ha y la proporción de maíz cultivado con respecto al área total de la subcuenca. Asumiendo que la cantidad de pesticidas empleados es proporcional al porcentaje de maíz cultivado, puede concluirse que el dato de **densidad de ganado por Ha está correlacionado con la dosis de pesticidas aplicada** y probablemente con las concentraciones de residuos en suelos agrícolas y aguas.

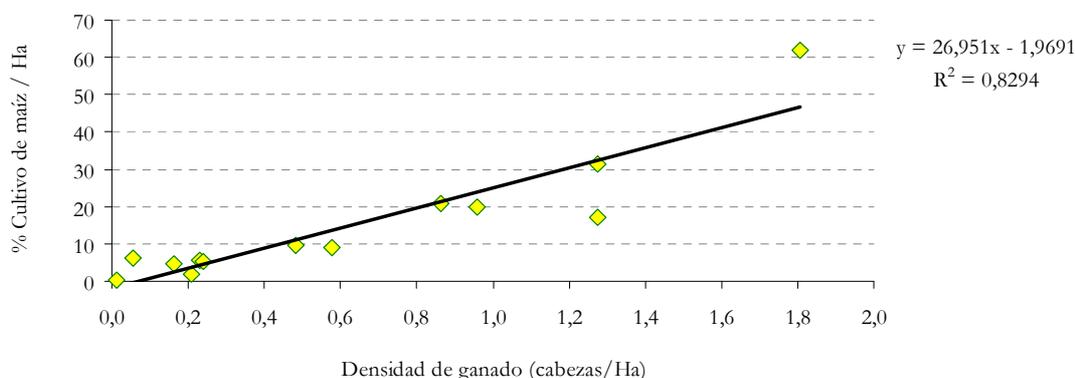


Figura IV.C.2. Correlación entre densidad de ganado y proporción de maíz cultivado por subcuenca para la cuenca del Xallas

1.2.1. Fortificación de las muestras.

La fortificación se realizó mediante adición de una mezcla que contenía todos los compuestos en metanol a la muestra de agua filtrada, agregando un volumen igual al 1% del volumen de muestra tratada. Tras homogeneizar el contenido de la botella con agitación mecánica, se guardaron las muestras en la nevera a 4°C durante media hora para permitir las interacciones entre analito y matriz. Transcurrido este tiempo se realizó la extracción siguiendo el procedimiento que se detalla a continuación, esquematizado en la figura IV.C.3.

1.3. PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN: SPE.

La muestra de agua recibida en el laboratorio se filtra con ayuda de un sistema de filtración a vacío con una placa de porosa sobre la que se coloca una membrana de celulosa de 0,45 μm . En este primer paso se eliminan todos los restos como hojas, pequeñas ramas, partículas finas o tierra que pueden estar suspendidas en el agua. Aquellas muestras que fueron recogidas en épocas de mucha lluvia resultaron especialmente sucias debido al consecuente arrastre de partículas, provocando en ciertas ocasiones el taponamiento de los filtros.

Una vez que el agua está filtrada, se fortifica una alícuota de 200 mL con el subrogado (y con el resto de los analitos en caso de realizar estudios que así lo requieran) a un nivel de 50 pg mL^{-1} en muestra para atrazina-D5 y 100 pg mL^{-1} para mecoprop-D3 (lo que supone un extracto de 20 ng mL^{-1} y 40 ng mL^{-1} respectivamente en el hipotético caso de recuperar la totalidad del analito) y se realiza la SPE siguiendo el procedimiento descrito en la figura IV.C.3.

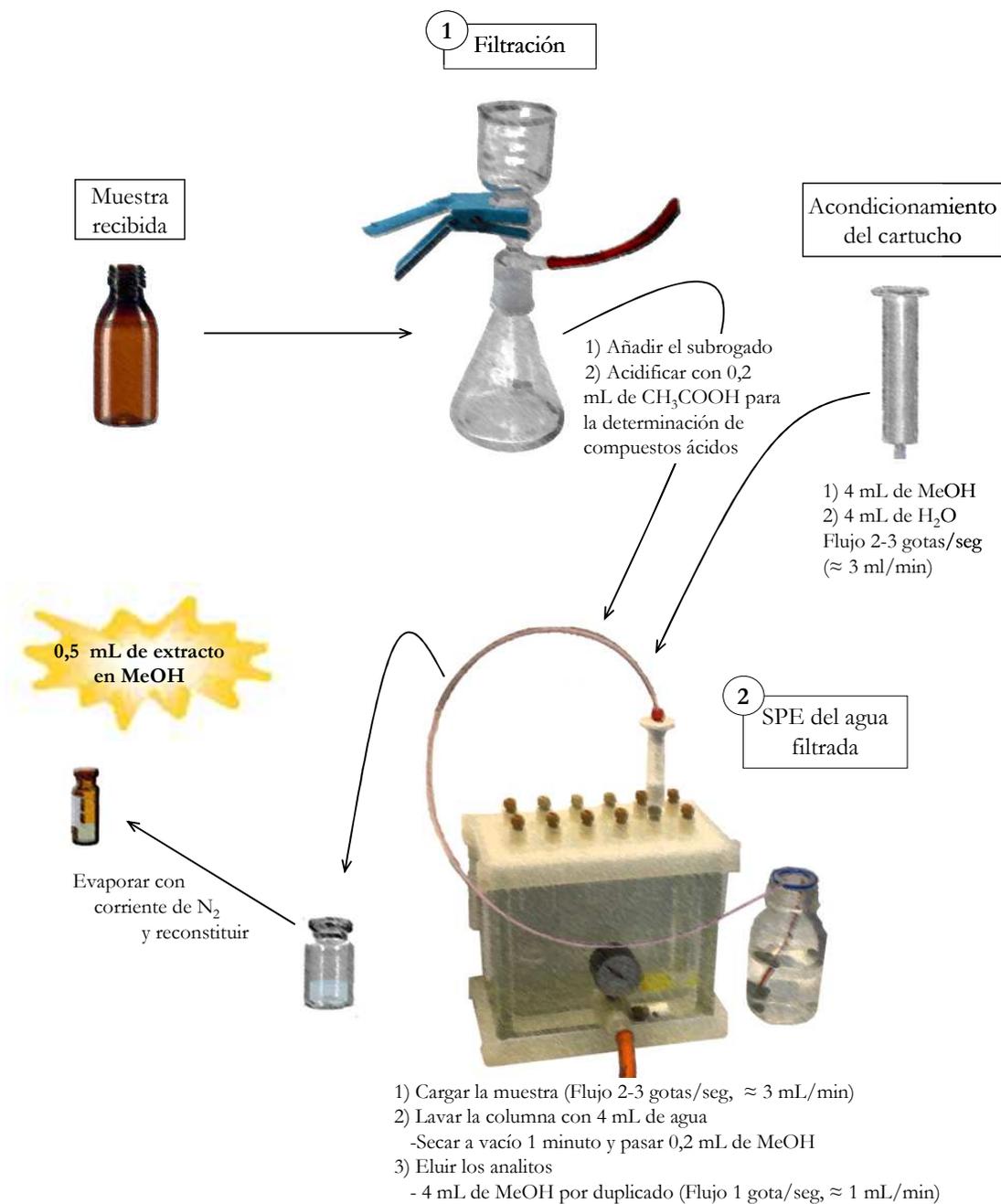


Figura IV.C.3. Procedimiento de extracción de muestras de agua de río por SPE

En este caso se han utilizado columnas de SPE Oasis™HLB. La SPE se realiza asistida por un dispositivo de vacío (Visiprep Manifold) y otro de autoalimentación de los cartuchos, con el que se logra automatizar el proceso de carga de la muestra. Dado que el volumen a tratar es de 200 mL, se asegura de esta forma que el agua pase a través de la columna de extracción de una forma más homogénea. Tras acondicionar los cartuchos (4 mL de metanol seguidos de 4 mL de agua), se procede a cargar la muestra sobre los cartuchos; para finalizar con esta primera etapa, se arrastra el posible volumen residual que pudiera quedar en el material utilizado añadiendo 4 mL de agua HPLC al recipiente que contenía la muestra. Por último, antes de proceder a la elución, se lavan los cartuchos con 4 mL de agua HPLC y se desplaza el resto de agua de los mismos con 200 µL de metanol.

La elución de los compuestos se lleva a cabo con 8 mL de metanol (en dos eluciones consecutivas con 4 mL) que se evaporan a sequedad para reconstituirlo en un volumen final de 0,5 mL de metanol y proceder a su análisis en el LC-MS/MS. De esta forma se logra la **concentración de los analitos en un factor 400** lo que permite determinar cantidades muy bajas en muestra (del orden de pg mL⁻¹).

Bajo estas condiciones **los compuestos ácidos son poco retenidos en la columna de SPE**, por lo que su determinación no puede realizarse de una forma satisfactoria. Por ello se vuelve a extraer una segunda alícuota de muestra filtrada a la que se le añade, previamente a la extracción, 200 µL de ácido acético para lograr **condiciones de pH ácido** bajo las cuales la retención en el cartucho de HLB de los fenoxiácidos y otros compuestos de pKa bajo es efectiva (estos analitos se corresponden con los determinados en polaridad negativa).

1.4. DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN.

Para la detección y cuantificación de los analitos se utilizó un **cromatógrafo de líquidos Thermo Fisher Scientific** (presentado en los apartados anteriores) trabajando en modo **SRM (Selected Reaction Monitoring)**, con ionización positiva y negativa.

Tabla IV.C.2. Condiciones cromatográficas empleadas para la separación y detección de los analitos.

COLUMNA			
Symmetry Shield (Waters)	Fase estacionaria	C ₁₈	
	Dimensiones	150×2,1mm	
	Tamaño de partícula	3 μm	
	Tamaño de poro	100 Å	
FASE MÓVIL			
Régimen	Gradiente		
A	Agua tamponada con ácido fórmico al (0,15%) y formiato amónico (3mM)		
B	Metanol “tamponado” con ácido fórmico al (0,15%) y formiato amónico (3mM)		
Flujo	200 μL min ⁻¹		
T ^a	25°C		
Gradiente de fase móvil	Tiempo (min)	% H ₂ O	% MeOH
	0	70	30
	1	70	30
	15	10	90
	17	10	90
	23	70	30
	26	70	30

Tiempo (min)	% MeOH
0	30
1	30
15	90
17	90
23	30
26	30

DETECTOR		
Modo de ionización	Positivo	Negativo
Voltaje del spray (V)	3800	3000
T ^a del vaporizador (°C)	200	50
T ^a del capilar (°C)	350	350
Gas de impulsión (u.a.) ¹	35	35
Gas auxiliar (u.a.)	4	4
Voltaje del <i>skimmer offset</i> (V)	4	4
Tiempo de escaneo (ms)	5	20
Cono de barrido de iones	4	0

En todos los casos se inyectaron en el cromatógrafo 10 μL tanto de los patrones de los compuestos (para la realización de rectas de calibrado) como de los extractos, puesto que la matriz de agua no presenta interferencias que puedan dañar la fuente de ionización e inyectando más cantidad de muestra se logra mayor sensibilidad en las determinaciones.

2. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

2.1. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS.

Se optimizaron los aspectos relativos a la fuente de ionización y las energías de colisión de los compuestos evaluados para lograr una buena determinación de los mismos. Los pesticidas no determinados en el caso del estudio de leche de vaca se introdujeron directamente en la fuente a una concentración de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ y las energías de colisión de las transiciones MS/MS de cada uno de ellos fueron optimizadas para la determinación y cuantificación de los mismos. La tabla Tabla IV.C.3 recoge las transiciones utilizadas para cada uno de los compuestos.

Tabla IV.C.3. Transiciones SRM y energías de colisión para la detección y cuantificación de los pesticidas estudiados

Compuesto	T _R	Ionización (+ / -)	Ión precursor (m/z)	Primera transición		Segunda transición	
				Ión producto (m/z)	Energía de colisión (V)	Ión producto (m/z)	Energía de colisión (V)
2,4-D	14,2	HESI-	219,0	144,8	20	175,0	25
Acetocloro	13,9	HESI+	256,0	133,0	31	148,0	18
Alacloro	14,0	HESI+	270,0	238,1	10	162,2	22
Atrazina	12,2	HESI+	216,0	174,1	20	104,2	23
Atrazina-D5	12,1	HESI+	220,9	179,1	23	145,0	25
Bentazona	12,6	HESI-	239,1	197,2	19	132,0	30
Bromacil	12,6	HESI+	261,0	172,0	15	145,0	25
Bromoxinil	14,5	HESI-	274,0	167,0	45	79,0	35
Carbetamida	9,8	HESI+	237,0	120,2	13		
Cianazina	10,2	HESI+	241,1	214,1	16	120,1	
Clorfenvinfós	14,7	HESI+	358,9	205,0	23	170,0	33
Cloridazón	7,9	HESI+	222,0	104,0	22	77,5	26
Cloroxurón	14,4	HESI+	291,1	218,2	22	163,0	20
Clorpirifós	17,0	HESI+	349,9	198,0	17	125,1	15

Compuesto				Primera transición		Segunda transición	
	T _R	Ionización (+ / -)	Ión precursor (m/z)	Ión producto (m/z)	Energía de colisión (V)	Ión producto (m/z)	Energía de colisión (V)
DEA	8,5	HESI+	188,1	146,1	17	104,0	27
DETBA	11,2	HESI+	202,1	146,1	18	104,2	28
DIA	6,3	HESI+	174,1	132,2	14	104,2	22
Diclorprop	7,3	HESI+	235,7	204,0	20	141,0	31
Dimefurón	12,6	HESI+	339,1	256,0	17	140,0	30
Dimetenamida-P	12,8	HESI+	276,1	244,0	12	168,1	21
Dinoterb	17,2	HESI-	239,1	207,0	29	176,0	46
Diurón	13,2	HESI+	233,0	72,0	16	160,3	20
Etidimurón	6,9	HESI+	265,0	208,1	19	162,1	21
Etofumesato-NH ₄ ⁺	13,1	HESI+	304,0	241,0	11	121,0	18
Fenitrotión	12,8	HESI+	278,1	246,0	13		
Fipronil	16,2	HESI-	435,0	330,0	16	317,0	24
Fluazifop	13,6	HESI+	328	282,0	17	91,0	27
Fluroxipir	15,8	HESI-	253,0	195,0	22	233,0	18
Fosalona	15,8	HESI+	367,9	182,0	12	138,0	28
Haloxifop	15,1	HESI+	362	316,0	15	91,0	27
Imidacloprid	6,0	HESI+	256,0	209,0	17	175,0	22
Ioxinil	15,6	HESI-	370,0	215,0	38	127,0	50
Isoproturón	12,1	HESI+	207,2	134,0	22	72,4	13
Linurón	14,2	HESI+	249,1	182,0	20	160,0	16
Lufenurón	19,3	HESI-	508,9	325,8	21	174,9	38
MCPA	14,3	HESI-	199,0	141,0	21	161,0	22
Mecoprop	15,0	HESI-	213,0	105,0	42	141,0	14
Mecoprop-D3	15,0	HESI-	216,0	104,2	23	174,1	20
Metabenzthiazurón	12,4	HESI+	222,0	165,1	18	150,1	35

Compuesto	T _R	Ionización (+ / -)	Ión precursor (m/z)	Primera transición		Segunda transición	
				Ión producto (m/z)	Energía de colisión (V)	Ión producto (m/z)	Energía de colisión (V)
Metabromurón	12,5	HESI+	259,0	170,0	24	148,0	16
Metalaxil	11,1	HESI+	280,1	220,1	16	192,2	17
Metamitrona	7,1	HESI+	203,1	175,1	16	104,0	21
Metazacloro	11,5	HESI+	278,1	210,1	12	134,2	20
Metil pirimifós	15,1	HESI+	306,1	164,1	25	108,0	25
Metolacloro	13,9	HESI+	284,2	176,2	26	134,0	26
Metoxurón	9,3	HESI+	229,1	156,0	36	72,0	28
Mevinfós	7,5	HESI+	225,0	127,0	13	109,0	32
Monolinurón	12,0	HESI+	215,0	126,2	20	99,0	39
Prometrina	12,1	HESI+	242,0	200,1	19	158,1	23
Propazina	13,4	HESI+	230,0	188,0	17	146,1	22
Simazina	10,7	HESI+	202,1	132,2	24	124,0	19
Sulcotriona	10,7	HESI-	328	292,0	22	256,2	17
Terbutilazina	13,6	HESI+	230	104,0	31	174,1	21
Terbutrina	12,2	HESI+	242	186,1	19		
Triadimefón	13,6	HESI+	294	197,0	15	141,0	27
Triazofós	13,9	HESI+	314	162,1	18	119,1	35

La figura IV.C.4 ilustra un cromatograma obtenido bajo estas condiciones para un extracto de una muestra de agua superficial recogida en el río Govia (finca del CIAM), fortificada con los analitos a 100 pg mL⁻¹, que será utilizada para realizar la estimación de los parámetros de calidad del método.

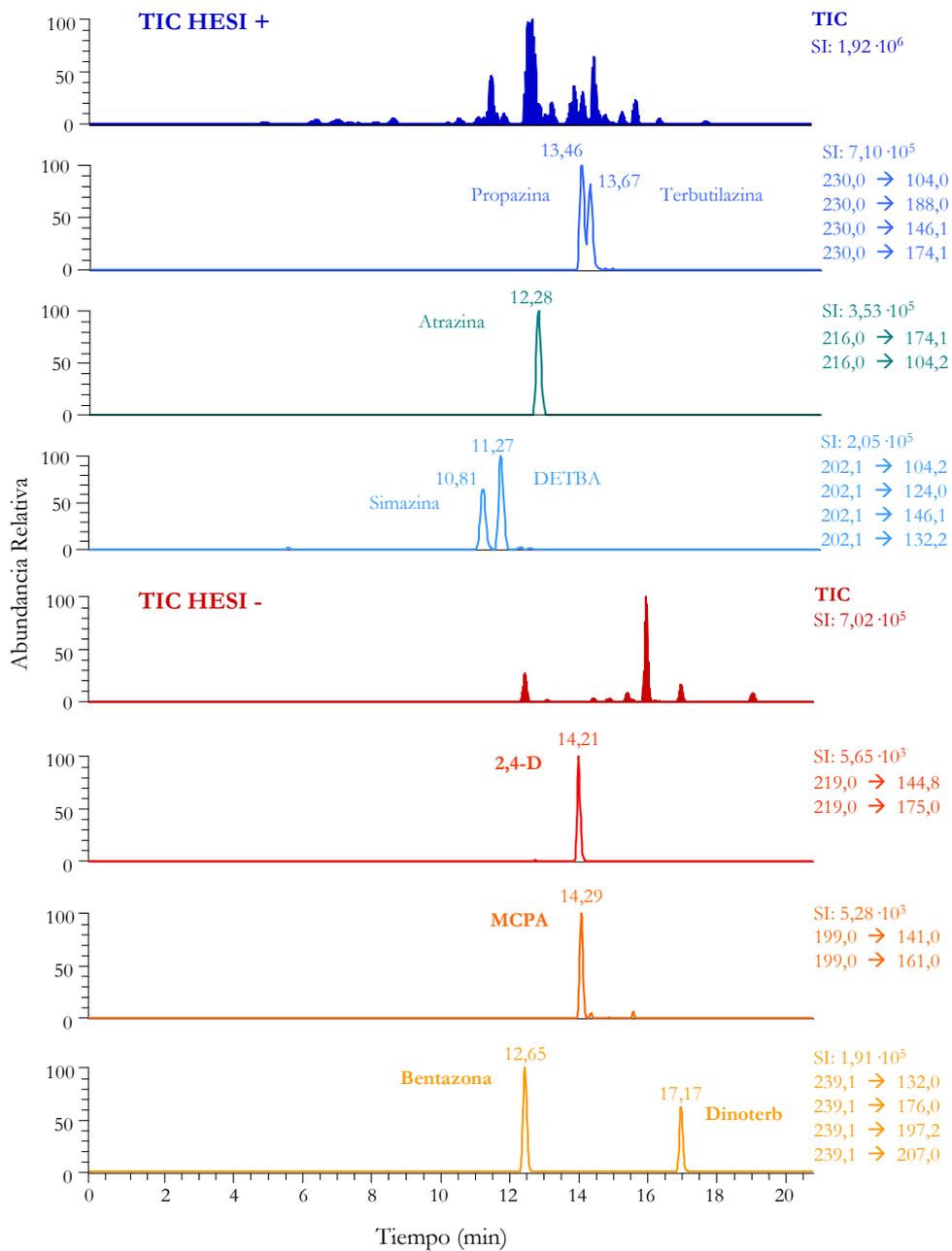
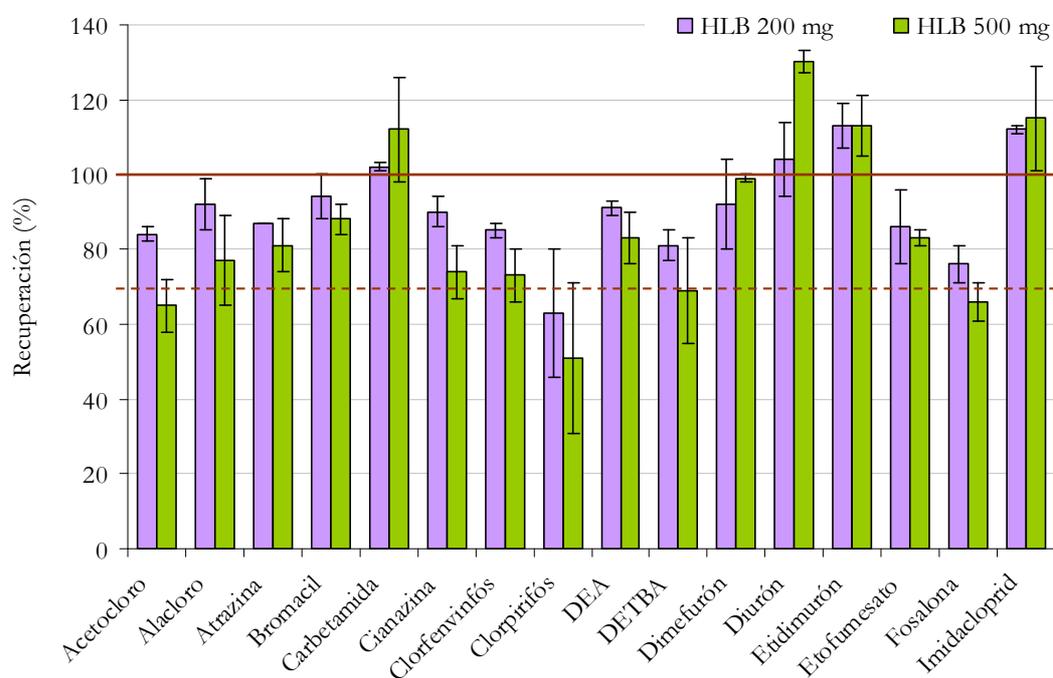


Figura IV.C.4. Cromatogramas obtenidos tras el análisis cromatográfico con el LC-MS/MS de 10 µl de un extracto de agua superficial fortificada a una concentración de 100 pg mL⁻¹

2.2. PRUEBAS PREVIAS.

2.2.1. Selección del cartucho utilizado.

Se decidió utilizar el empaquetado HLB comercializado por Oasis, puesto que al tratarse de un copolímero con una componente hidrófoba y otra hidrófila, es capaz de retener compuestos de un amplio rango de polaridades. Se realizó un estudio previo fortificando 1000 mL de agua milli-Q con 100 ng de los analitos para obtener una concentración de 100 pg mL⁻¹ y se analizaron dos alícuotas de 200 mL por triplicado con columnas de SPE de empaquetado HLB conteniendo 200 y 500 mg de producto respectivamente. Los 4 ensayos se realizaron al mismo tiempo, aplicando la metodología de extracción descrita anteriormente.



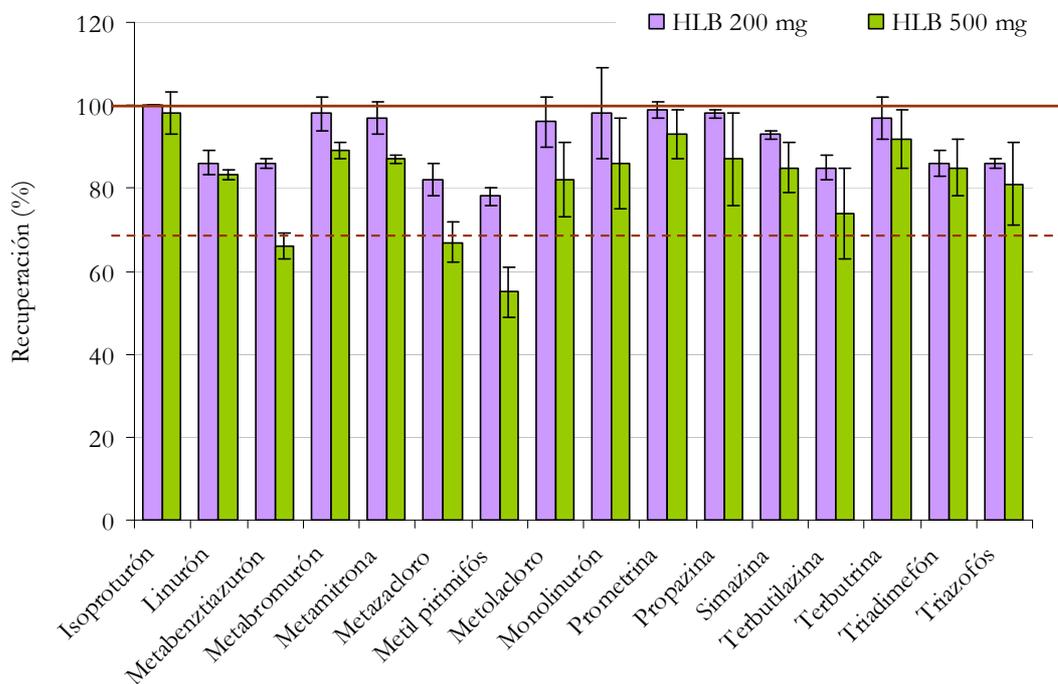


Figura IV.C.5. Recuperaciones obtenidas con los dos cartuchos Oasis™ HLB para algunos de los compuestos.

En general con ambos cartuchos se obtienen buenas respuestas, si bien con el empaquetado de 500 mg (barras verdes en el gráfico) las determinaciones fueron menos exactas y menos precisas a juzgar por las recuperaciones y las barras de error. Posiblemente la disminución de respuesta se debe a que al haber más cantidad de adsorbente los compuestos se retienen más fuertemente y se necesitaría eluir con un volumen mayor de metanol.

Tras evaluar los resultados se seleccionó el **empaquetado de 200 mg** para realizar la extracción de los compuestos.

2.3. PARÁMETROS DE CALIDAD DEL MÉTODO.

La validación del método propuesto se ha realizado evaluando parámetros analíticos como **linealidad, precisión, límites de detección y cuantificación**. Exceptuando la linealidad, el resto de los parámetros se han calculado a partir de muestras de agua superficial recogidas en el río Govia, fortificadas a dos niveles de concentración (100 pg mL^{-1} y 500 pg mL^{-1}) señalados como “nivel bajo” y “nivel alto” de fortificación respectivamente, teniendo en cuenta los valores de las NCA-CMA establecidos para los compuestos determinados como prioritarios.

En los sucesivos apartados se detallan y comentan los resultados obtenidos para el estudio de validación realizado.

2.2.1. Linealidad.

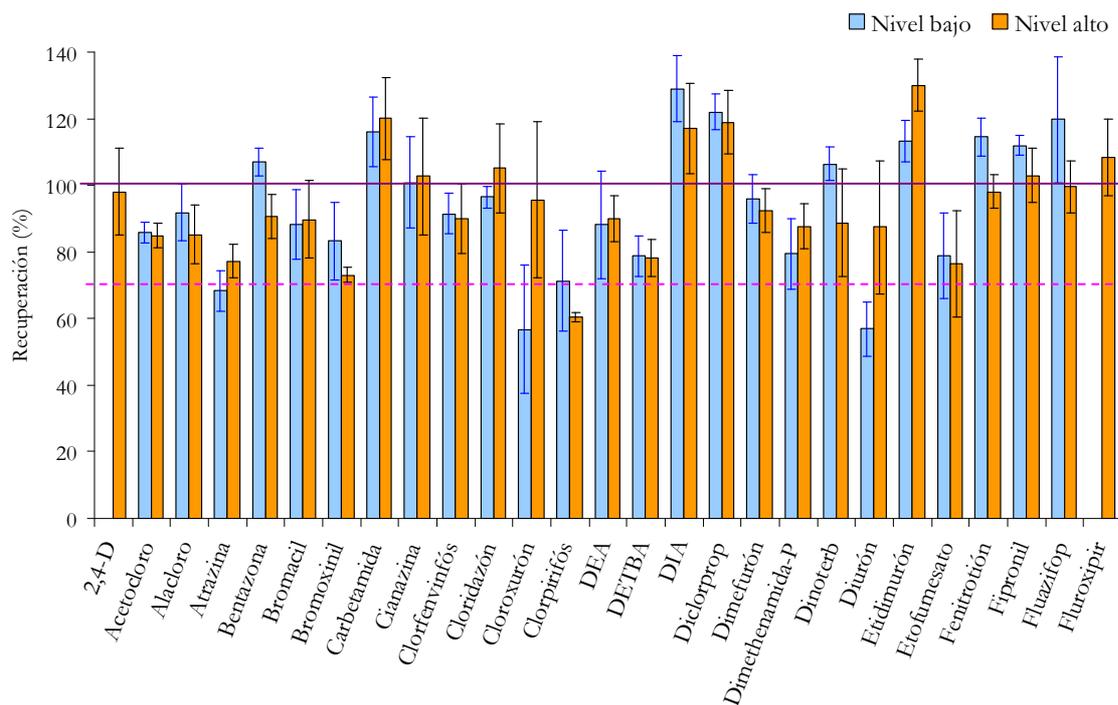
Se ha considerado el estudio de linealidad de la calibración externa en un rango de $0,5$ a 100 ng mL^{-1} dependiendo de la sensibilidad requerida para los compuestos estudiados. De esta forma, para evaluar los compuestos que resultaron más sensibles el rango seleccionado fue de $0,5$ a 50 ng mL^{-1} . Para aquellos compuestos “menos sensibles” se evaluó la linealidad en el rango de 20 a 100 ng mL^{-1} . Para ello se han evaluado 5 rectas de calibrado independientes con 7 niveles de concentración, obteniendo por lo tanto 5 rectas de calibrado para cada compuesto.

El análisis estadístico mediante la aplicación del test F de Fisher y el test Q de Cochran a un nivel de confianza $\alpha=1\%$, denotan un ajuste lineal de los puntos del calibrado y la existencia de homogeneidad en las varianzas, de forma que se puede afirmar que los 56 compuestos evaluados (54 pesticidas y los subrogados) se ajustan al modelo lineal en el rango de concentración estudiado.

A la hora de evaluar muestras reales, aquellos extractos que presentaron respuestas positivas para alguno de los compuestos con concentraciones calculadas superiores al nivel alto del calibrado (100 ng mL^{-1}), fueron analizados nuevamente aplicando la conveniente dilución para forzar una concentración que se encontrara dentro del rango lineal del calibrado.

2.2.2. Exactitud y precisión.

La estimación de la **exactitud** y la **precisión** del método se realizó a partir de un **triplicado (n=3)** de dos muestras de agua superficial fortificadas a los **niveles de 100 y 500 pg mL⁻¹** respectivamente para cada uno de los compuestos investigados.



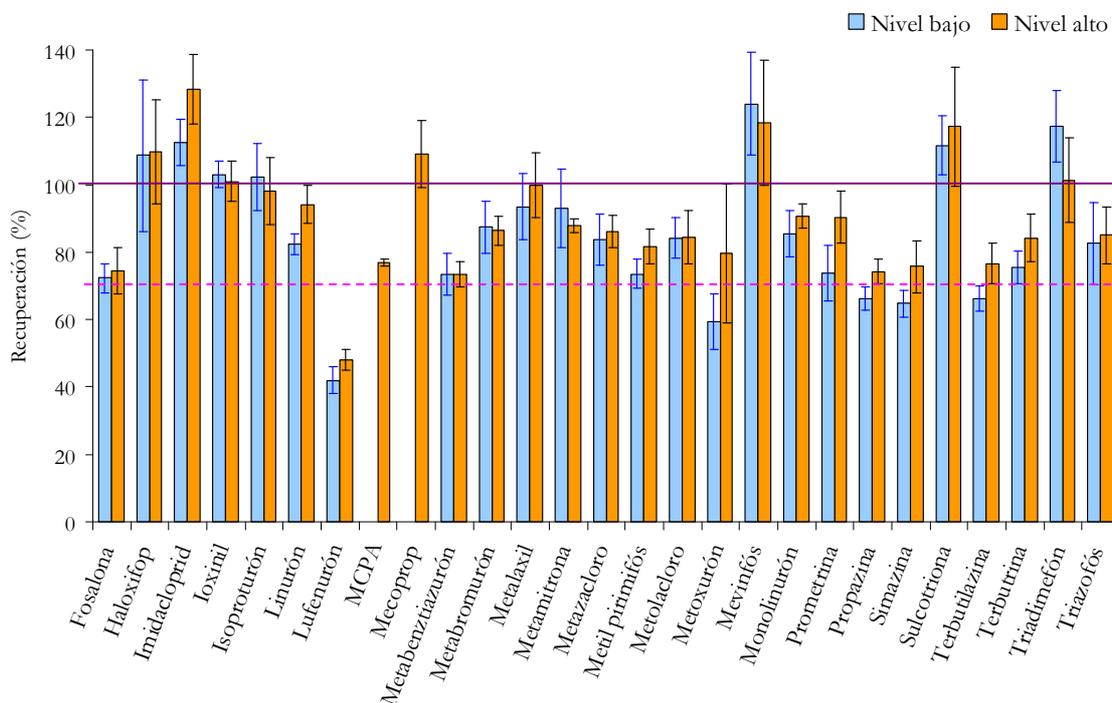


Figura IV.C.6. Gráficos de comparación de las recuperaciones obtenidas con ambos niveles de concentración.

Estos niveles de concentración en muestra se corresponden con extractos metanólicos de 40 y 200 ng mL⁻¹ respectivamente. Esto obliga a diluir el extracto obtenido para el nivel alto de concentración, aplicando un factor de dilución 4 para alcanzar extractos de 40 ng mL⁻¹.

Se puede apreciar en la figura anterior que la **mayoría de los compuestos tienen una recuperación superior a 70%** para ambos niveles de concentración, mientras que solamente para lufenurón se registraron valores de recuperación inferiores. Asimismo, para 4 de los compuestos (2,4-D, fluroxipir, MCPA, y mecoprop) en el estudio de fortificación a 100 ppt (pg mL⁻¹) se obtuvieron recuperaciones erróneas muy superiores a 100% que no se incluyen en esta gráfica.

El estudio al nivel bajo de concentración proporciona recuperaciones comprendidas entre 80 – 120 % para 30 de los analitos estudiados mientras que para el nivel alto de

fortificación son 40 los compuestos que presentan recuperaciones incluidas en este rango por lo que se puede afirmar que la metodología empleada resulta satisfactoria para extraer los analitos de la matriz.

Por último, en lo relativo a los valores de recuperación, resaltar que los compuestos incluidos en la lista de sustancias prioritarias presentan recuperaciones satisfactorias.

Tal y como se deduce a partir de las barras de error de las gráficas anteriores, la mayor parte de los compuestos presentan un valor de **RSD inferior a 15%**; de hecho, para el nivel de fortificación de 500 pg mL⁻¹, esto se cumple para 47 de los compuestos, 38 de los cuales muestran valores de RSD inferiores incluso a 10%. Para los 7 analitos restantes, el RSD registrado rondó el valor de 18% a excepción del cloroxurón, para el cual es de 23. Evaluando el nivel bajo de fortificación se puede observar el mismo comportamiento, puesto que, a excepción de 4 compuestos de entre los cuales solamente el haloxifop tiene una RSD de 22%, el resto de analitos registraron valores de RSD por debajo de 15%, siendo inferior a 10 para cerca de 40 compuestos.

En consecuencia, y teniendo en cuenta que se está evaluando un método multirresiduo para 54 compuestos, puede decirse que **la metodología propuesta resultó suficientemente precisa y exacta** para poder cuantificar de forma satisfactoria la gran mayoría de los analitos objeto del estudio.

2.2.4. LODs y LOQs.

Se evaluaron los límites de cuantificación y detección a partir de los cromatogramas obtenidos para el nivel de fortificación de 100 pg mL⁻¹ para todos los compuestos, a excepción de 2,4-D, fluroxipir, MCPA y mecoprop, para los cuales se utilizó el nivel de 500 pg mL⁻¹. El cálculo de los límites se realizó utilizando el método de la extrapolación de la relación entre la señal y el ruido (s/n) de los picos cromatográficos. En ningún caso se utilizaron señales con una s/n superior a 200. Para realizar el cálculo, el LOQ se ha establecido para una concentración que proporcionaría una relación señal/ruido de 10, mientras que para el caso del LOD la relación señal/ruido sería de 3.

Los valores de LOD y LOQ reflejados en la tabla IV.C.4 están corregidos con los valores de recuperación calculados para cada uno de los analitos, y se presentan referidos a la concentración en la muestra de agua para poder compararlos mejor con los niveles máximos permitidos por la normativa europea.

De forma general, los límites de detección y cuantificación fueron inferiores a 5 y 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente. Solamente se estimaron LODs superiores a 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para 2,4-D, fluroxipir, MCPA, mecoprop, y sulcotriona, compuestos que no presentan rendimientos de ionización muy importantes en nuestra fuente de HESI bajo las condiciones analíticas “multirresiduo”.

Todos los valores de LOQ calculados para aquellos compuestos que están incluidos en la lista de sustancias prioritarias cumplen con un margen muy amplio con la concentración máxima admisible especificada en la Directiva 2008/105/CE [1].

Tabla IV.C.4. Valores calculados de límites de detección y cuantificación.

Compuesto	LOD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Concentración Máxima Admisible (NCA-CMA) ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Media Anual (NCA-MA) ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
2,4-D	30,6	102,0		
Acetocloro	3,8	12,8		
Alacloro	2,9	9,6	700	300
Atrazina	0,3	0,9	2000	600
Bentazona	0,3	0,9		
Bromacil	1,5	5,1		
Bromoxinil	1,2	4,0		
Carbetamida	1,5	5,0		
Cianazina	1,1	3,8		
Clorfenvinfós	1,3	4,3	300	100
Cloridazón	1,2	4,0		
Cloroxurón	5,5	18,4		
Clorpirifós	1,0	3,5	100	30
DEA	1,1	3,8		
DETBA	1,2	3,9		
DIA	9,2	30,8		
Diclorprop	0,9	3,0		
Dimefurón	0,8	2,7		
Dimethenamida-P	0,3	1,0		
Dinoterb	0,6	2,1		

Compuesto	LOD (pg mL ⁻¹)	LOQ (pg mL ⁻¹)	Concentración Máxima Admisible (NCA-CMA) (pg mL ⁻¹)	Media Anual (NCA-MA) (pg mL ⁻¹)
Diurón	13,9	46,2	1800	200
Etidimurón	1,2	4,0		
Etofumesato	6,4	21,5		
Fenitrotión	1,0	3,3		
Fipronil	0,4	1,3		
Fluazifop	1,0	3,2		
Fluroxipir	25,0	83,3		
Fosalona	0,9	3,0		
Haloxifop	3,8	12,8		
Imidacloprid	1,4	4,7		
Ioxinil	0,8	2,5		
Isoproturón	1,5	5,0	1000	300
Linurón	7,6	25,3		
Lufenurón	2,2	7,4		
MCPA	26,0	86,6		
Mecoprop	29,5	98,3		
Metabenzthiazurón	8,6	28,6		
Metabromurón	1,6	5,5		
Metalaxil	0,3	0,9		
Metamitrona	5,5	18,4		
Metazacloro	0,9	3,0		
Metil pirimifós	0,4	1,2		
Metolacloro	2,3	7,5		
Metoxurón	12,4	41,3		
Mevinfós	2,4	8,1		
Monolinurón	2,0	6,7		
Prometrina	0,1	0,3		
Propazina	0,2	0,6		
Simazina	1,0	3,4	4000	1000
Sulcotriona	25,0	83,3		
Terbutilazina	0,4	1,4		
Terbutrina	0,1	0,4		

Compuesto	LOD (pg mL ⁻¹)	LOQ (pg mL ⁻¹)	Concentración Máxima Admisible (NCA-CMA) (pg mL ⁻¹)	Media Anual (NCA-MA) (pg mL ⁻¹)
Triadimefón	0,5	1,5		
Triazofós	0,4	1,3		

En el marco legal la Directiva 2009/90/CE referente a *las especificaciones técnicas del análisis químico y del seguimiento del estado de las aguas*, establece para los parámetros de calidad del método que el límite de cuantificación de la metodología analítica desarrollada debe estar al menos un 30% por debajo de las normas de calidad medioambiental [20]. Gracias a la sensibilidad del detector de MS/MS utilizado, se puede **cuantificar analitos a un nivel concentración muy inferior al valor de CMA** estipulado en las normas de calidad ambiental, cumpliendo con creces con lo especificado en la directiva a la que se hace referencia. En algunos casos como el de la atrazina y la simazina, el método permitiría la cuantificación de niveles de **entre hasta 200 veces inferiores a la concentración máxima admisible**, según los cálculos teóricos.

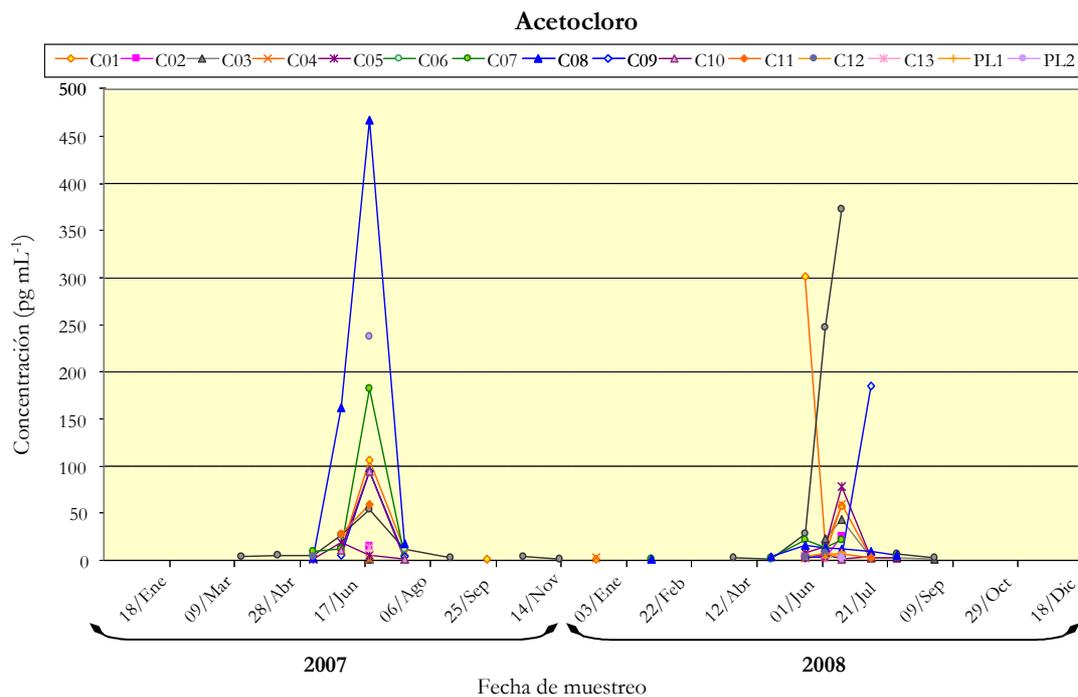
2.3. ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LOS RESULTADOS EN AGUAS SUPERFICIALES.

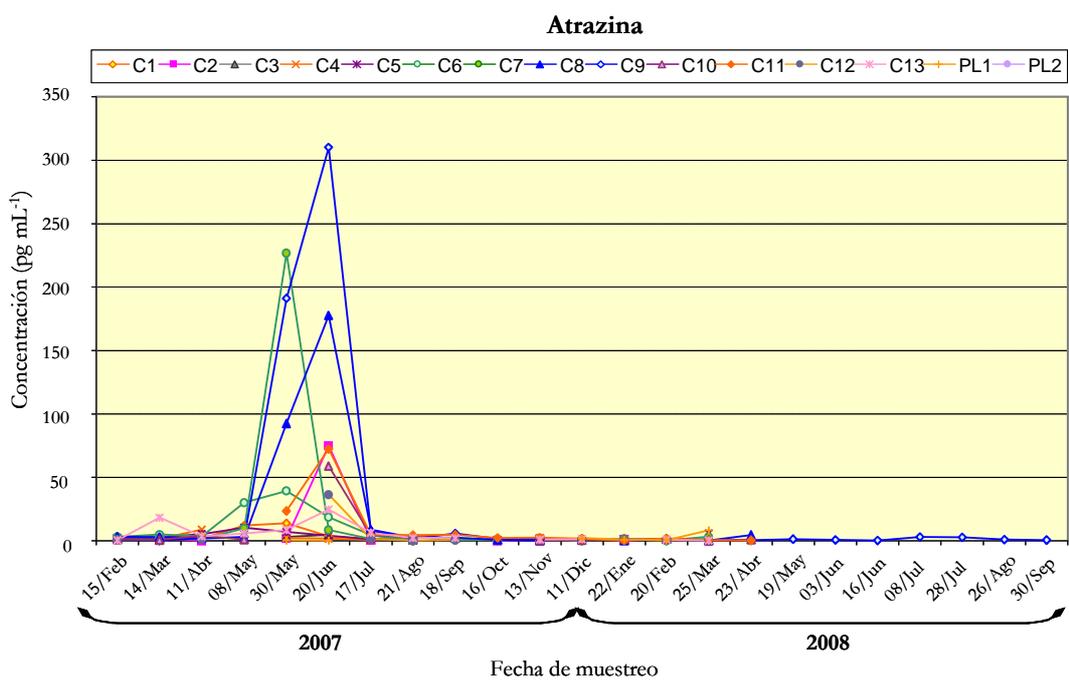
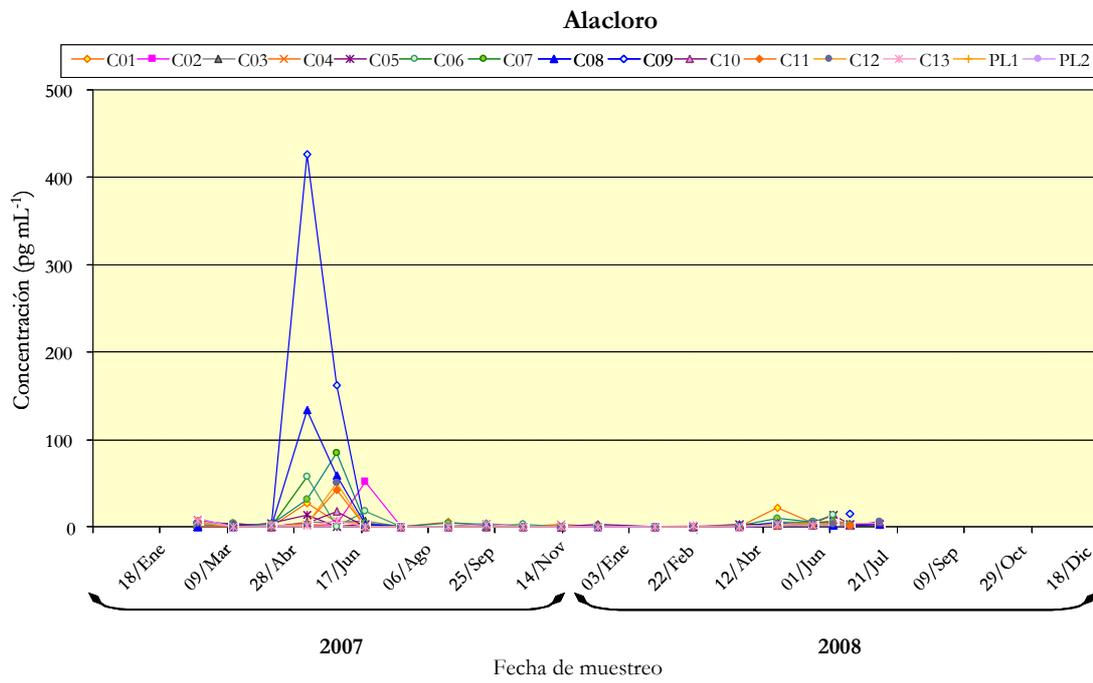
Los análisis de las más de 300 muestras de agua de los ríos Xallas y Miño recibidas en el laboratorio durante el período de muestreo (desde enero del 2007 a octubre de 2008) pusieron de manifiesto que **atrazina, acetocloro, alacloro y terbutilazina fueron los compuestos detectados y cuantificados con más frecuencia** (notablemente superior al resto de pesticidas), por lo que se decidió centrar el estudio de discusión de resultados en estos 4 analitos. En un solo caso, se tuvo en cuenta la contribución del alacloro (C12, 2007).

A continuación se muestra la variación en las concentraciones determinadas de estas sustancias a lo largo de los dos años de muestreo.

2.3.1. Residuos de pesticidas encontrados en aguas superficiales de la cuenca del Xallas.

Para los cuatro compuestos detectados con mayor frecuencia se registraron residuos en las subcuencas **C01, C02 y de C06 a C12** durante el período de **abril a agosto del año 2007**, con concentraciones que resultaron en algunas ocasiones superiores a **300 pg mL⁻¹** en los meses de **mayo y junio**.





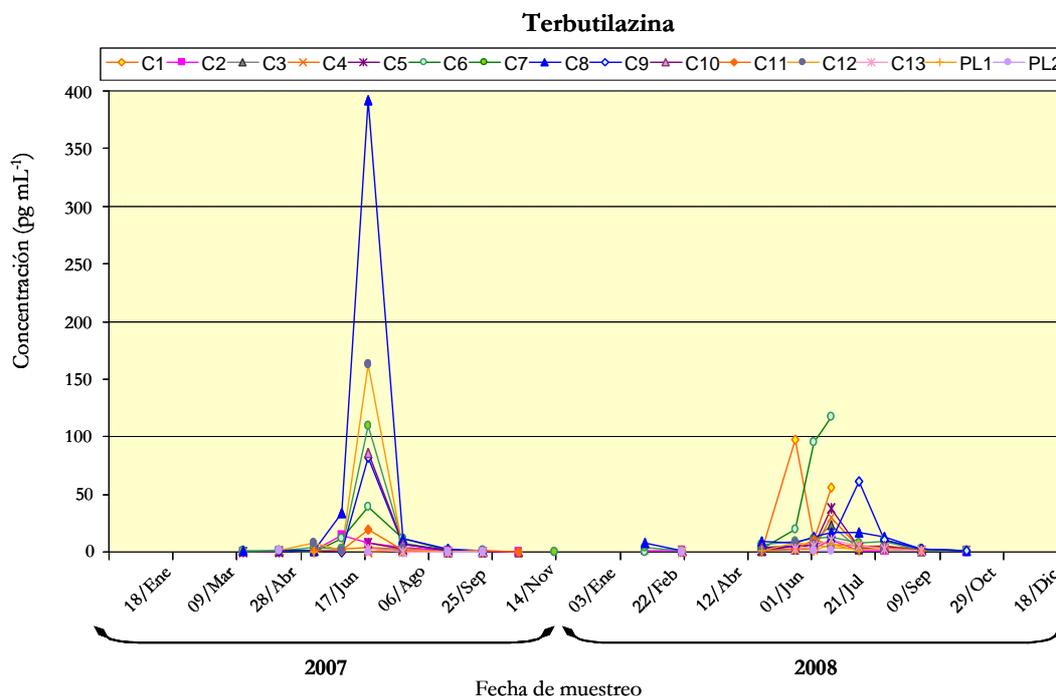


Figura IV.C.7. Evolución de las concentraciones determinadas para acetocloro, alacloro, atrazina y terbutilazina en los 15 puntos de muestreo de la cuenca del Xallas durante los dos años de estudio.

Tal y como se muestra en las gráficas anteriores, **en el año 2008** para el mismo período de meses (entre abril y agosto) se registraron también residuos de **terbutilazina y acetocloro** en las cuencas **C01, C06 y C09**; estos valores fueron inferiores a los determinados para la misma época en año 2007.

Además de estos 4 compuestos, los metabolitos de la atrazina y la terbutilazina, **DEA y DETBA** respectivamente, aparecieron a niveles de entre 20 y 50 pg mL^{-1} en aquellas muestras en donde se registró una mayor cantidad de residuos para sus compuestos padre.

Resaltar también la presencia de **metolacloro**, que se determinó a una concentración próxima a 20 pg mL^{-1} en C02 en el mes de mayo del 2007. Además, al siguiente mes se determinó este mismo nivel de concentración en C08, C09, C10 y C11. Para C12 en ese mismo muestreo se determinó metolacloro con una concentración notablemente más elevada (del orden de 240 pg mL^{-1}). En cualquiera de los casos las concentraciones decayeron a nivel de trazas en el mes o los dos meses sucesivos.

Por último, los herbicidas **isoproturón** y **diurón**, así como los insecticidas **clorfenvinfós** y **clorpirifós** incluidos en la lista de sustancias prioritarias en aguas, **nunca** fueron detectados.

A modo de ejemplo se muestra el cromatograma obtenido para la muestra correspondiente al muestreo de junio del 2007 de la subcuenca C09.

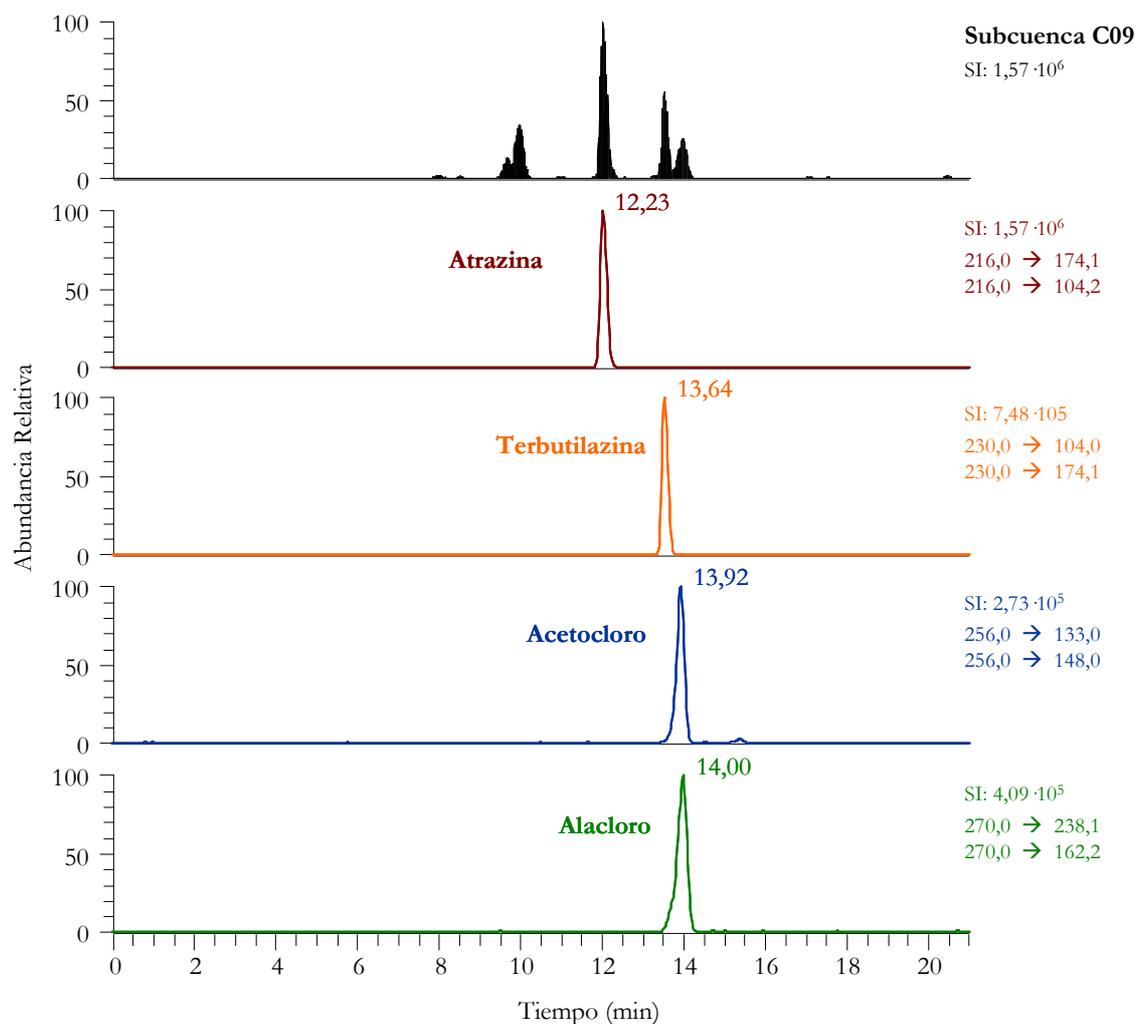


Figura IV.C.8. Cromatograma en TIC y reconstituido en base a las transiciones SRM de atrazina, alacloro, acetocloro y terbutilazina para la subcuenca C09 del muestreo de junio de 2007 para la cuenca del río Xallas.

2.3.2. Concentración total de pesticidas para la cuenca del Xallas.

Se ha evaluado la suma de las concentraciones de todos los pesticidas registradas en cada una de las subcuencas para todos los muestreos realizados.

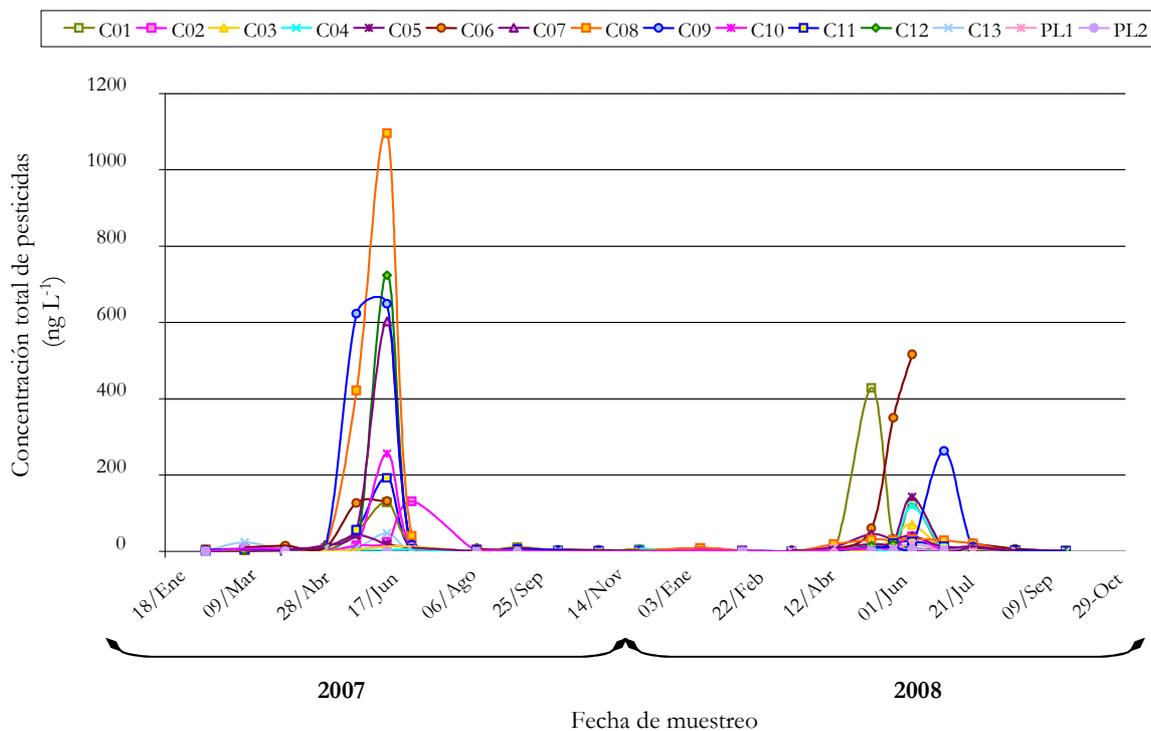
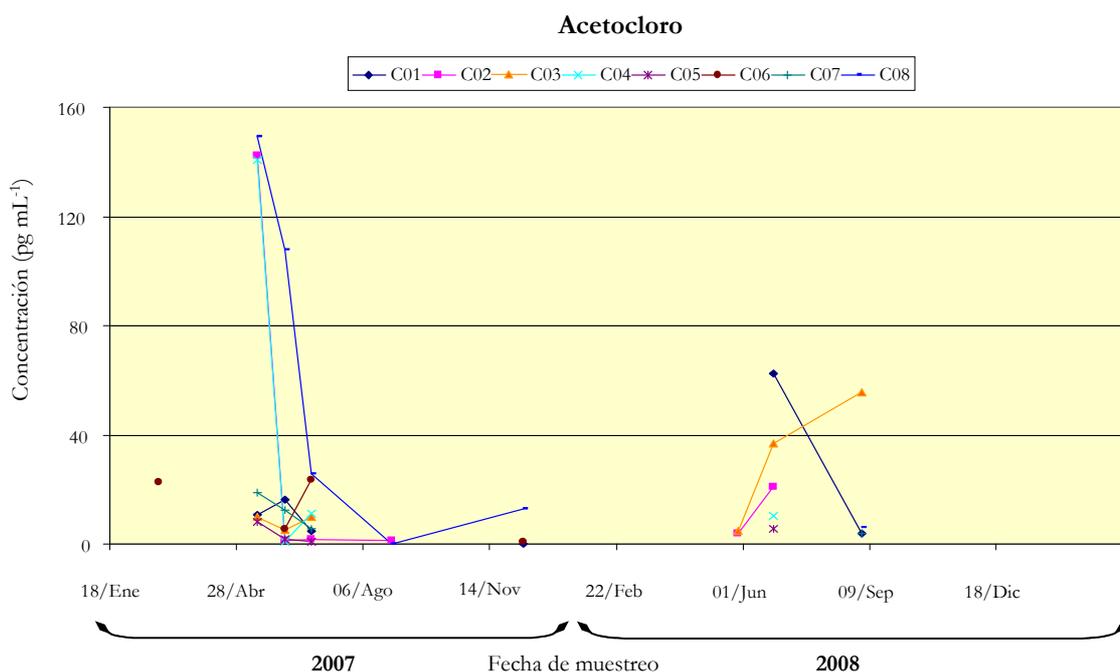


Figura IV.C.9. Evolución de la concentración total de pesticidas determinada para cada una de las subcuencas del río Xallas.

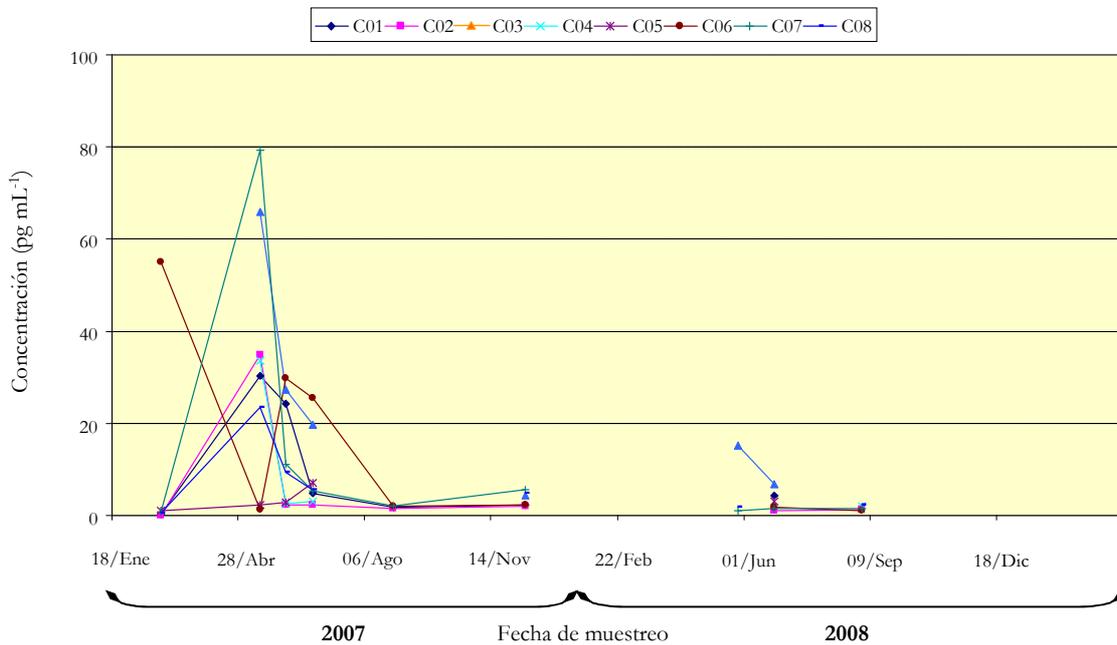
Como se puede observar, en **C08** para el muestreo de **junio de 2007** la suma de las concentraciones fue superior a 1000 ng L^{-1} , mientras que **C07**, **C09** y **C12** estuvieron a un nivel entre 600 y 750 ng L^{-1} . Globalmente las concentraciones máximas registradas en 2008 fueron inferiores a las registradas en el 2007.

2.3.3. Residuos de pesticidas encontrados en aguas superficiales de la cuenca del alto Miño.

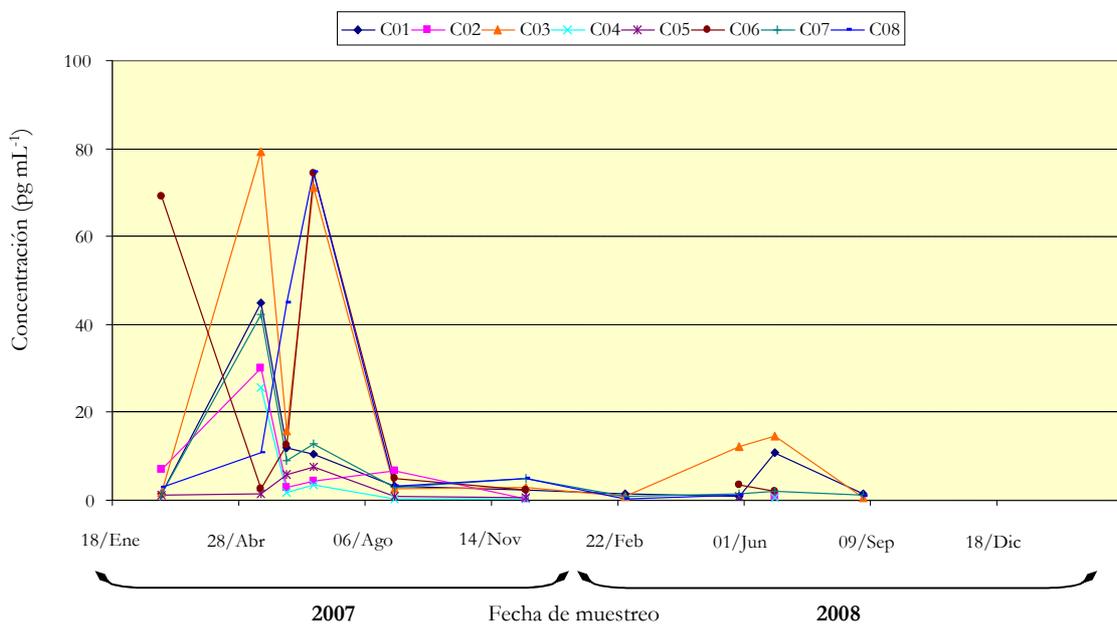
Al igual que para el caso anterior, los compuestos detectados con mayor frecuencia en la cuenca del río Miño fueron **acetocloro, alacloro, atrazina y terbutilazina** aunque esta vez se cuantificaron a concentraciones inferiores en comparación con el río Xallas. Sin embargo, existe un comportamiento común en cuanto al perfil de variación de concentraciones determinadas, que tuvieron sus máximos entre los meses **de mayo y julio del 2007**.



Alacloro



Atrazina



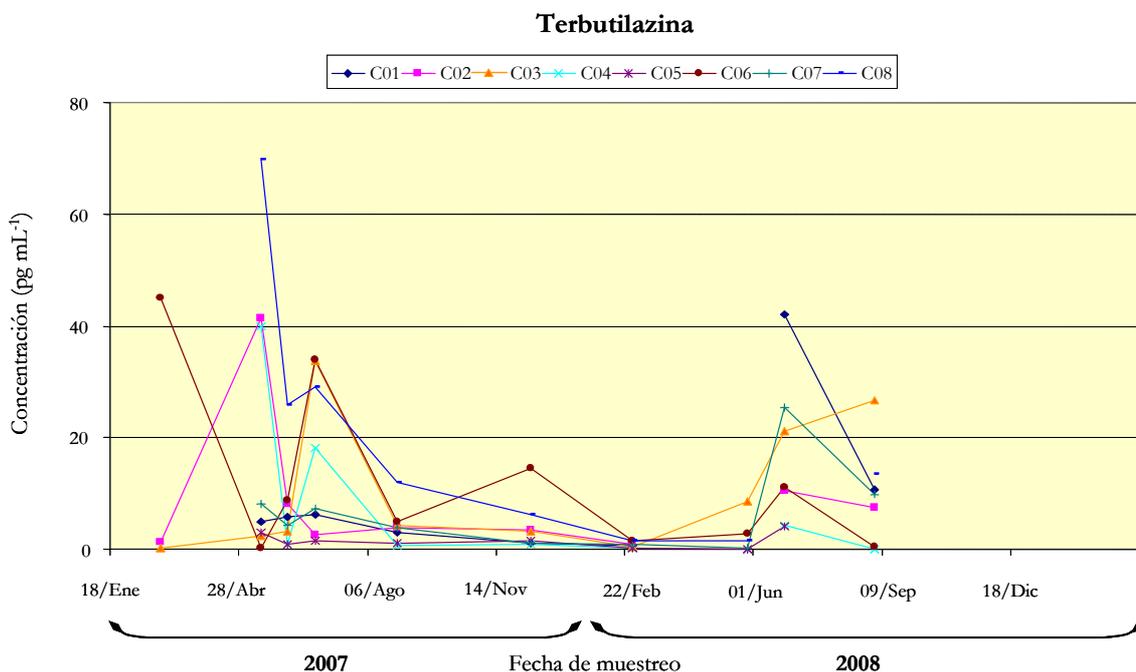


Figura IV.C.10. Evolución de las concentraciones determinadas para acetocloro, alacloro, atrazina y terbutilazina en los 8 puntos de muestreo en la cuenca del alto Miño durante los dos años de estudio.

Las concentraciones máximas estuvieron en torno a las 80 pg mL^{-1} en **C03, C06 y C08 para atrazina; C03, C06 y C07 para alacloro; y C8 para terbutilazina** que presenta también residuos a niveles más bajos en las cuencas de C01 a C06 a excepción de C05. En el caso del **acetocloro** se determinaron concentraciones a un nivel de 150 pg mL^{-1} para **C02, C04 y C08**. También para el río Miño volvieron a detectarse residuos en el **año 2008** entre los meses de junio a septiembre, con valores entre 30 y 40 pg mL^{-1} para **terbutilazina** y rondando los 80 para **acetocloro** en algunos puntos de muestreo.

En cuanto a los metabolitos de la atrazina y terbutilazina se encontraron en este caso a nivel de trazas para **DEA y DETBA** en la cuenca C08 durante los meses de verano de 2007 (niveles de concentración del orden de 5 pg mL^{-1}) mientras que se registraron para los mismos muestreos niveles de 20 pg mL^{-1} para **DIA**.

2.3.4. Concentración total de pesticidas para la cuenca del alto Miño.

La suma de las concentraciones de todos los pesticidas no proporcionó niveles superiores a 300 ng mL^{-1} para ninguna de las subcuencas. Tal y como se apuntó para la cuenca de Xallas, el mayor valor de suma de concentraciones se registró entre los muestreos de mayo y junio de 2007.

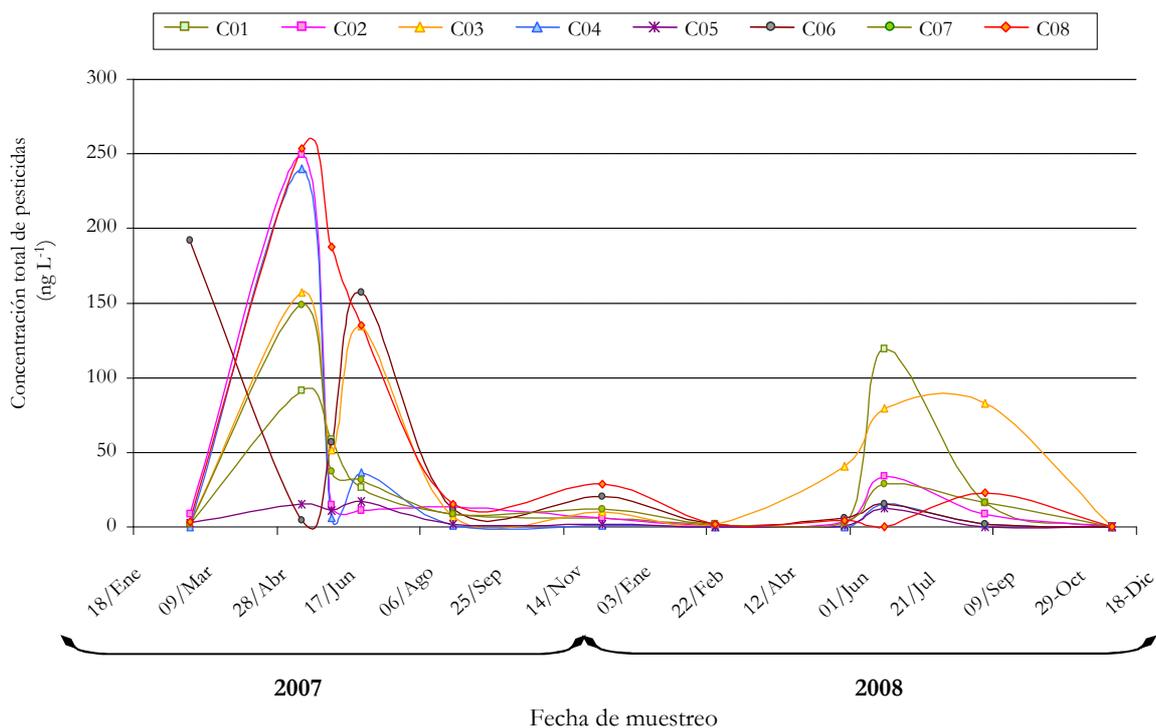


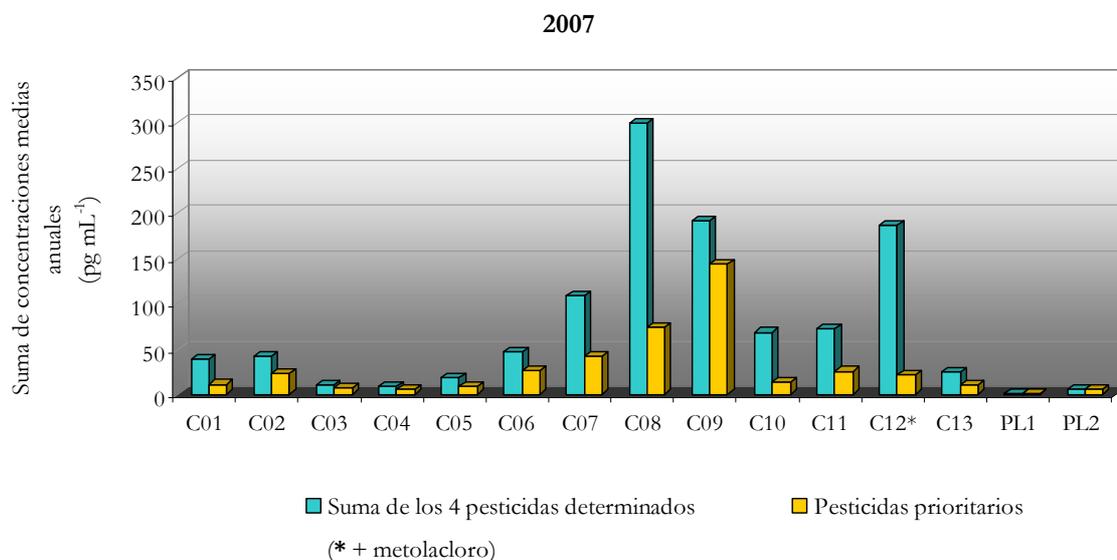
Figura IV.C.11. Concentración total de pesticidas determinada para cada una de las subcuencas del río Miño.

2.3.3. Evaluación de las concentraciones medias anuales.

Las **normas de calidad ambiental** también establecen limitaciones en las **concentraciones medias anuales (NCA-MA)**. A continuación se muestran unas gráficas en donde se comparan las concentraciones de cada una de las cuencas muestreadas durante el año 2007 y 2008, para el sumatorio de los 4 analitos determinados más frecuentemente (acetocloro, alacloro, atrazina y terbutilazina) y para el sumatorio de los dos compuestos prioritarios evaluados (alacloro y atrazina).

2.3.3.1. Cuenca del río Xallas

Durante el año **2007** las subcuencas en donde se registró una mayor cantidad de residuos de los cuatro analitos fueron **C08, C09** y **C12**. Las dos primeras fueron las que presentaron una mayor carga bovina por Ha de entre todas las subcuencas estudiadas (1,8 y 1,3 respectivamente). En contraste, la subcuenca C12 presentó una baja densidad de carga ganadera (0,16 animales/Ha). Una aplicación inadecuada de acetolor, terbutilazina y metolacolor podría ser la causa de esta inesperada alta concentración.



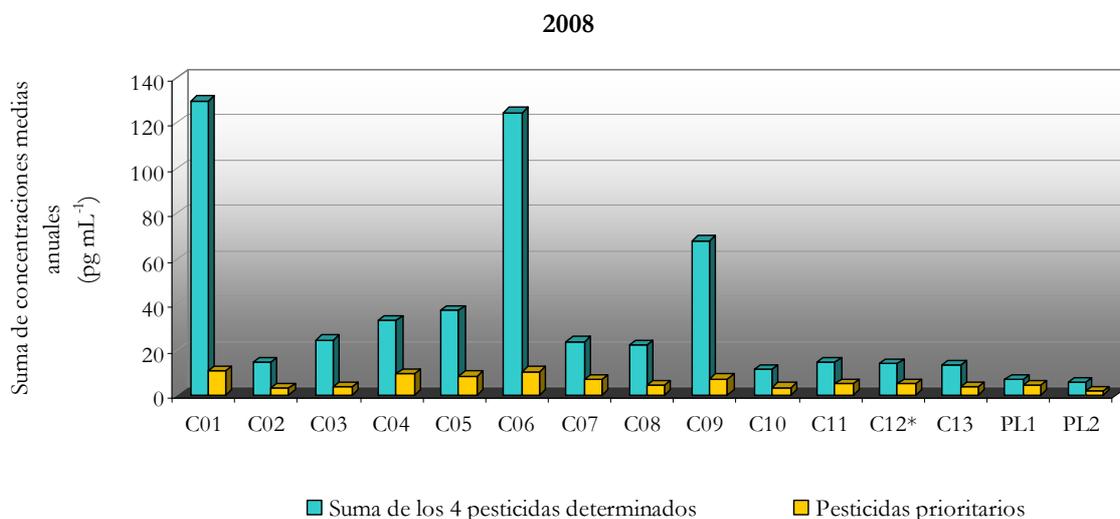
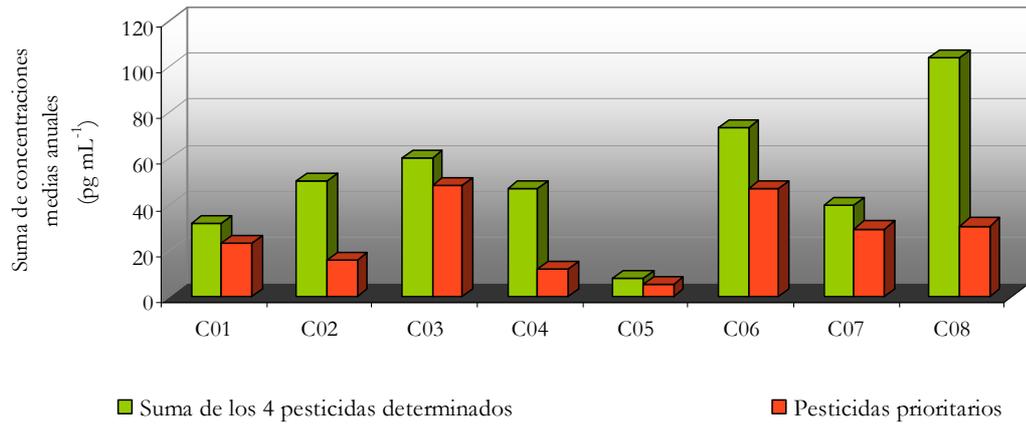


Figura IV.C.12. Media anual de concentraciones determinadas para la cuenca del río Xallas.

Para el año **2008**, **C01** y **C06** pasaron a ser las subcuencas con valores de concentración más altos. En **C09** las concentraciones disminuyen hasta 3 veces para la suma de los 4 pesticidas y casi en un factor 15 para las sustancias prioritarias. Para **C08** y **C12**, se puede observar una drástica caída en las concentraciones con respecto a 2007. En el caso de C12, estos valores concordaron con lo esperado a juzgar por la densidad de ganado bovino en esta zona.

2.3.3.1. Cuenca del río Miño.

2007



2008

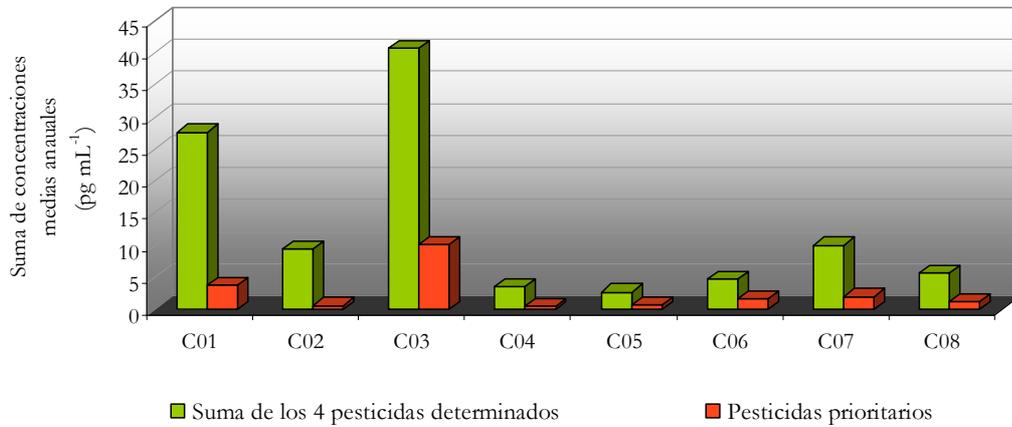


Figura IV.C.13. Media anual de concentraciones determinadas para la cuenca del alto Miño.

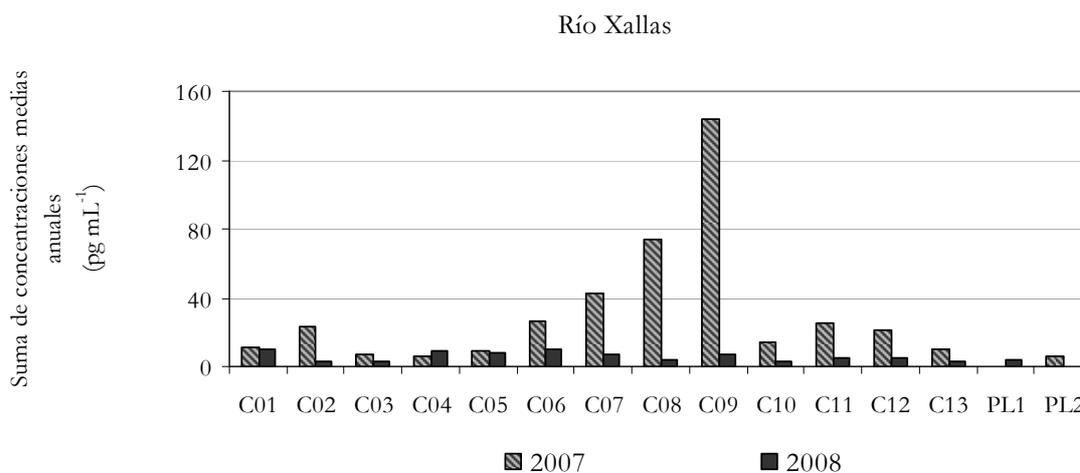
En 2007 las concentraciones medias variaron de 10 a 100 ng mL⁻¹ registrando un nivel máximo en C06 y C08 (con densidad de ganado bovino del orden de 0,8).

En 2008 las concentraciones medias disminuyeron drásticamente (particularmente en C06 y C08) a excepción de dos de las subcuencas (C01 y C03, en donde la densidad bovina por Ha es del orden de 1,5). En éstas se registró un descenso del 15 y 30% respectivamente.

El estrecho rango de variación de las concentraciones medias entre las subcuencas no permitieron establecer correlación entre la densidad de ganado por Ha y los niveles de contaminación observados.

2.3.4. Variación en la concentración estimada de sustancias prioritarias.

Otra de las comparaciones de los resultados obtenidos permite evaluar la **variación de la concentración media anual** para la suma de los herbicidas **alacloro y atrazina** (sustancias prioritarias) en las cuencas del Xallas y del Miño.



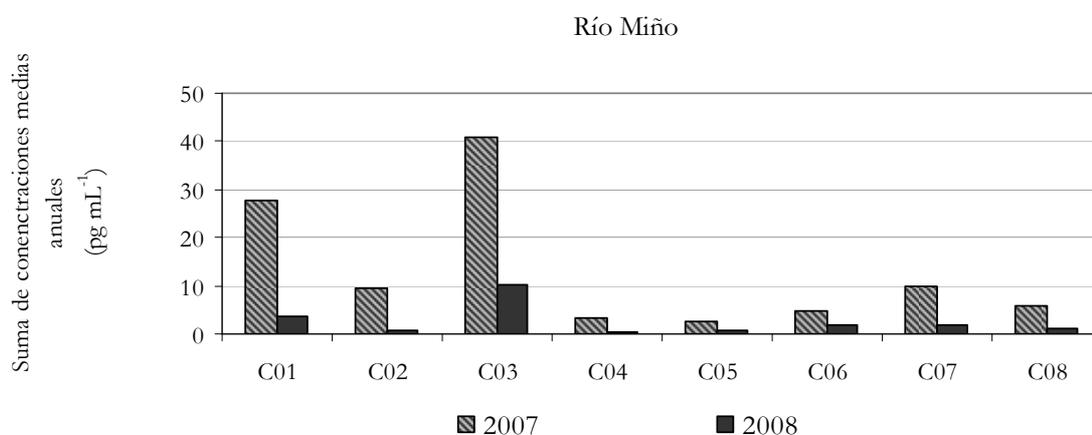


Figura IV.C.14. Media anual de concentraciones determinadas para la suma de las sustancias prioritarias detectadas en ambas cuencas para los dos años de muestreo.

Como se puede observar en las gráficas, la concentración media anual de las sustancias prioritarias monitorizadas **decae en el año 2008** con valores que no superan los 10 pg mL^{-1} . **Desde enero del 2008 está prohibido en España el uso de atrazina y alacloro**, lo cual se ha visto reflejado en las muestras analizadas, y es la causa de las bajas concentraciones determinadas para los muestreos recogidos durante ese año en comparación con los del 2007.

2.4. EVALUACIÓN DE LA INFORMACIÓN DERIVADA DEL ESTUDIO.

Toda la información adquirida permite evaluar distintos aspectos relativos al estado de contaminación de las aguas superficiales y a la variación de presencia de pesticidas en las mismas.

De las 7 sustancias prioritarias evaluadas en este apartado del trabajo presentado, solamente para los herbicidas, **alacloro y atrazina** se pudo realizar un seguimiento puesto que para el resto, en las ocasiones en que se detectaron algunos residuos, siempre fueron estimados a concentraciones inferiores al LOQ establecido para cada uno de los compuestos. Por otra parte, las concentraciones de **atrazina** y **alacloro** nunca fueron superiores a sus respectivas concentraciones máximas admisibles. Los herbicidas **bentazona** y **mecoprop**, que son objeto

de estudio para ser incluidos en la lista de sustancias prioritarias o sustancias peligrosas prioritarias, **nunca fueron detectados en ninguna de las cuencas evaluadas.**

Se puede establecer un **perfil de concentración** en las aguas de estos ríos **en función de la época del año**; se ha observado que las cantidades detectadas varían de forma estacional: en cualquiera de los casos, en primavera y verano (meses de marzo a septiembre) se determinaron la gran mayoría de positivos, registrando tanto en 2007 como en 2008 los valores máximos de concentración entre mayo y junio. Precisamente durante el año 2007 en la cuenca del Xallas se registraron precipitaciones de 31 y 180 L/m² en el período que coincidió con las fechas de muestreo de mayo y junio, respectivamente. Debido a estas fuertes precipitaciones, los pesticidas pudieron ser movilizados más fácilmente.

Las cuencas que en 2007 presentaron una mayor cantidad de residuos, no coinciden con las de 2008, posiblemente debido a la retirada de la atrazina y el alacloro, que fueron de entre los herbicidas más utilizados durante el año 2007. La notable **ausencia de alacloro y atrazina** en las muestras **durante el año 2008** (figura IV.C.7) denota el cumplimiento de los agricultores de la zona con lo establecido por la ley, y pone de manifiesto la repercusión real que tiene el empleo de estos pesticidas sobre las aguas superficiales en términos de contaminación difusa, puesto que el cese en la aplicación de estas sustancias se ve reflejado en el nivel de contaminación que se registra en las aguas.

Los perfiles de concentraciones que se establecieron para ambas cuencas a lo largo de los dos años de estudio, presentan máximos entre abril y julio y niveles muy bajos para el resto del año. Por lo tanto, parece que los suelos agrícolas no constituyen una fuente de liberación de estas sustancias que implique una contaminación gradual importante en las aguas superficiales. El diagnóstico de la contaminación de los suelos agrícolas en la cuenca del Xallas podría proporcionar información adicional sobre la hipótesis anterior.

Para la **cuenca del Miño, la suma total de los pesticidas cuantificados fue inferior a 500 pg mL⁻¹** tanto en 2007 como en 2008. Las concentraciones de pesticidas individuales solo superaron los 100 de pg mL⁻¹ de acetocloro entre mayo y junio de 2007, lo que indica que esta agua podría haber sido **apta para el consumo humano** sin necesidad de aplicar ningún tipo de tratamiento específico durante 10 meses (Directiva 98/83/CE [21]) . **En la cuenca del Xallas** para los meses de junio y julio de 2008 se registraron concentraciones puntuales de acetocloro y terbutilazina superiores a 100 pg mL⁻¹ y, precisamente en esta época, se superó el umbral de 500 pg mL⁻¹ para la suma total de las concentraciones determinadas. En este caso, un tratamiento específico hubiera sido necesario durante los meses de primavera y verano.

Recientes publicaciones acerca del estado de ciertos ríos europeos muestran concentraciones máximas de acetocloro, alacloro, atrazina y terbutilazina superiores a las determinadas a lo largo de esta investigación [22]

Se han contrastado los resultados obtenidos sobre la cuenca del río Miño con una investigación publicada por *Hildebrandt et al.* [23] para la evaluación de residuos de metolacoloro y ciertas triazinas en este mismo río durante el año 2000. Las concentraciones determinadas en el trabajo de *Hildebrandt et al.* para terbutilazina y atrazina resultaron ser inferiores a las presentadas en esta Tesis.

Por último *Claver et al.* [24], determinaron residuos de pesticidas en su estudio de la cuenca del Ebro entre los que se encuentran clorfeninfos, clorpirifós, alacloro metolacoloro y ciertas triazinas como atrazina, terbutilazina (y su metabolito DETBA), o simazina. En las muestras evaluadas en esta Tesis para los ríos Miño y Xallas nunca se determinó ningún residuo de clorpirifós o simazina; por otra parte, en lo relativo atrazina y terbutilazina, los valores concentración media anual presentados en esta Memoria son similares a los mostrados en el artículo anteriormente citado.

La **buena calidad de las aguas superficiales observada** durante los dos años de muestreo pone de manifiesto que el cultivo intensivo de maíz forrajero no implica necesariamente una alta concentración de pesticidas en las aguas superficiales a lo largo del año. De hecho en la cuenca del alto Miño, a pesar de presentar una densidad bovina media por Ha de 0,83, se alcanzó en 2008 una excelente calidad de agua superficial.

3. BIBLIOGRAFÍA.

[1] Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on environmental quality standards in the field of water policy; *Off. J. Eur. Comm.*; L 348 , 24/12/2008 pp. 0084 – 0097

[2] Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy; *Off. J. Eur. Comm.*; L 327 , 22/12/2000 pp. 0001 – 0073

[3] Vryzas, Z.; Vassiliou, G.; Alexoudis, C.; Papadoulou-Mourkidou, E.; Spatial and temporal distribution of pesticide residues in surface waters in northeastern Greece; *Water Res.*; 43, **2009**, pp. 1-10.

[4] Guzzella, L.; Pozzoni, F.; Giuliano, G.; Herbicide contamination of surficial groundwater in Northern Italy. *Environ. Pollut.*; 142, **2006**, pp. 344-353.

[5] Lepom, P.; Brown, B.; Loos, R.; Quevauviller, P.; Wollgast, J.; Needs for reliable analytical methods for monitoring chemical pollutants in surface water under the European Water Framework Directive; *J. Chromatogr. A*; 1216, **2009**, pp. 302–315.

[6] Palma, P.; Kuster, M.; Alvarenga, P.; Palma, V.; Fernandes, R.; Soares, A.; López de Alda, M.; Barceló, D.; Barbosa, I.; Risk assessment of representative and priority pesticides, in surface water of the Alqueva reservoir (South of Portugal) using on-line solid phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry; *Environ. Int.*; 35, **2009**, pp 545-551

[7] Lambropoulou, D.; Sakkas, V.; Hela, D.; Albanis, T.; Application of solid-phase microextraction in the monitoring of priority pesticides in the Kalamas River (N.W. Greece); *J. Chromatogr. A*; 963, **2002**, pp. 107-116

[8] Momplaisir, G.; Rosal, G.; Heithmar, E.; Varner, K.; Riddick, L.; Bradford, D.; Tallent Halsell, D.; Development of a solid phase extraction method for agricultural pesticides in large-volume water samples; *Talanta*; 81, **2010**, pp. 1380-1386.

[9] Barrek, S.; Cren-Olivéa, C.; Wiest, L.; Baudot, R.; Guilhem, K.; Grenier-Loustalot, M.; Multi-residue analysis and ultra-trace quantification of 36 priority substances from the European Water Framework Directive by GC–MS and LC-FLD-MS/MS in surface waters; *Talanta* ; 79, **2009**, pp. 712–722.

[10] Feo, M.; Eljarrat, E.; Barceló, D.; A rapid and sensitive analytical method for the determination of 14 pyrethroids in water samples; *J. Chromatogr. A*, 1217, 2010, pp. 2248-2253.

[11] Mahmoud, M.; AlBishri, H.; Identification of dissolved organic species in non-drinking tap water by solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry; *J. Saudi Chem. Soc.*; 14, 2010, pp. 105-115.

[12] Boujelbane, F.; Oueslati, F.; Hamida, N.; A rapid determination and extraction of three carbamate insecticides using LC-ESI-MS/MS: Application to their identification in a real river water sample; *Desalination*, ; 250, 2010, pp. 473-478.

[13] Zhou, Q.; Xiao, J.; Ding, Y.; Sensitive determination of fungicides and prometryn in environmental water samples using multiwalled carbon nanotubes solid-phase extraction cartridge; *Anal. Chim. Acta*, ; 602, 2007, pp. 223-228.

[14] Zhou, Q.; Xie, G.; Xiao, J.; Wang, W.; Ding, Y.; Sensitive determination of fenprothrin, cyhalothrin and deltamethrin in environmental water samples using multiwalled carbon nanotubes cartridge prior to HPLC; *Chin. Chem. Lett.*; 19, 2008, pp. 95-98

[15] Rodrigues, A.; Ferreira, V.; Cardoso, V.; Ferreira, E.; Benoliel, M.; Determination of several pesticides in water by solid-phase extraction, liquid chromatography and electrospray tandem mass spectrometry; *J. Chromatogr. A*; 1150 2007, pp. 267-278.

[16] Aguilar, C.; Ferrer, I.; Borrull, F.; Marcé, R.; Barceló, D.; Monitoring of pesticides in river water based on samples previously stored in polymeric cartridges followed by on-line solid-phase extraction-liquid chromatography–diode array detection and confirmation by atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry; *Anal. Chim. Acta*; 386, 1999, pp. 237-248

[17] Método EPA SW846 3535A para tratamiento de aguas <<http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3535a.pdf> >

[18] Pestek, J.; Matyska, M.; *SPE Sorbents and Formats*. En “Solid-phase extraction: principles, techniques, and applications”; Simpson, N.; Ed. Marcel Dekker (Nueva York, USA); pp.19-33.

[19] Cuencas fluviales. FAO Fisheries Technical Paper-T202 <<http://www.fao.org/docrep/003/x6853s/X6853S02.htm>> (Consulta: 27-04-10).

[20] Commission Directive 2009/90/EC laying down, pursuant to Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council, technical specifications for chemical analysis and monitoring of water status.; *Off. J. Eur. Union*; L 201, 1 August 2009, pp. 36-38.

[21] Council Directive 98/83/EC of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption; *Off. J. Eur. Comm.*; L 330 , 05/12/1998, pp. 0032 - 0054.

[22] Konstantinou, I.; Hela, D.; Albanis, T.; The status of pesticide pollution in surface waters (rivers and lakes) of Greece. Part I. Review on occurrence and levels; *Environ. Pollut.*; 141, **2006**, pp. 555–570.

[23] Hildebrandt, A.; Guillamón, M.; Lacorte, S.; Tauler, R.; Barceló, D.; Impact of pesticides used in agriculture and vineyards to surface and groundwater quality (North Spain). *Water Res.*; 42, **2008**, pp. 3315–3326.

[24] Claver, A; Ormad, P; Rodríguez, L.; Ovelleiro, J.; Study of the presence of pesticides in surface waters in the Ebro river basin (Spain); *Chemosphere*, 64, 2006, pp.1437–1443.

IV.D. DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE PESTICIDAS EN MUESTRAS DE SUELO AGRÍCOLA.

La segunda parte del estudio en materia de contaminación medioambiental está centrada en **muestras de suelo agrícola** que han sido recogidas en explotaciones localizadas en la cuenca del río Xallas. El estudio realizado forma parte del proyecto de investigación INIA titulado: ***“Evaluación de la presencia de residuos de pesticidas en aguas y suelos agrícolas de explotaciones ganaderas en Galicia”***. Se ha planteado estimar el grado de presencia de pesticidas en suelos agrícolas y buscar una relación entre el nivel de contaminación y el calendario agronómico. Así mismo, nos propusimos relacionar estas observaciones con las determinaciones realizadas en aguas superficiales de la misma área. Este estudio pretende proporcionar una valiosa información acerca del nivel de contaminación medioambiental generada a partir de las prácticas agrícolas, así como **evaluar el destino final de los pesticidas aplicados en suelos agrícolas de Galicia**.

1. PARTE EXPERIMENTAL.	- 258 -
1.1. PATRONES EMPLEADOS. PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES.	- 258 -
1.2. DESCRIPCIÓN DE LAS ÁREAS MUESTREADAS Y DEL TRATAMIENTO DE MUESTRA	- 259 -
1.2.1. Pretratamiento de muestra.	- 260 -
1.2.2. Fortificación de las muestras.	- 260 -
1.2.3. Procedimiento de extracción utilizado	- 260 -
1.3. DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN.	- 261 -
2. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.	- 263 -
2.1. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS.	- 263 -
2.2. CONDICIONES DE LA EXTRACCIÓN ASISTIDA POR MICROONDAS.	- 264 -
2.3. PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO.	- 265 -
2.4. DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN DE LOS PESTICIDAS EN LOS SUELOS AGRÍCOLAS.	- 266 -
2.5. ESTIMACIÓN DE LOS LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN	- 271 -
2.6. INFLUENCIA DEL CONTENIDO DE MATERIA ORGÁNICA SOBRE LAS RESPUESTAS ANALÍTICAS DE LOS COMPUESTOS POR GC-MS/MS	- 272 -
2.7. DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE PESTICIDAS EN LAS 36 MUESTRAS DE SUELO RECOGIDAS EN EL PERIODO DE PRE-SIEMBRA.	- 275 -
3. BIBLIOGRAFÍA.	- 279 -

El suelo es uno de los medios más afectados en cuanto a contaminación por pesticidas puesto que recibe de forma directa gran mayoría de agroquímicos y actúa como filtro de aguas de lluvia que pueden arrastrar contaminantes suspendidos en el aire. La retención de los pesticidas en el suelo viene determinada por la presencia de **arcillas** o **materia orgánica**, además de la climatología (pluviosidad, viento, etc.) o la fotodegradación, y cada uno de estos factores afecta de forma distinta a los compuestos en función de sus características químicas, tal y como se ha explicado en el Capítulo I (apartado 5). Es por ello que muchos productos fitosanitarios, incluso aquellos que han sido prohibidos desde hace décadas por su probada toxicidad para el medio, los animales y/o los seres humanos, se detectan constantemente en esta matriz a niveles a veces superiores a los máximos permitidos [1-5].

Constantes publicaciones revelan la alta persistencia de plaguicidas en suelos agrícolas, como es el caso de organoclorados como 4,4-DDT y sus metabolitos; también es común la detección de restos de piretroides como tetrametrina, λ -cihalotrina o deltametrina, debido a la gran facilidad que tienen estos compuestos para retenerse en el suelo debido al bajo poder de lixiviación que los caracteriza (alto valor de K_{oc}). Residuos de insecticidas organofosforados como clorpirifós y herbicidas de tipo acetanilidas como acetocloro y alacloro, entre otros, también se detectan de forma habitual en esta matriz [6-9].

Estos pesticidas han sido comúnmente analizados por aquellas metodologías aplicadas a matrices sólidas como extracciones sólido líquido o extracción Soxhlet, que han mostrado buenos resultados con matriz de suelo. Debido a los elevados volúmenes de disolvente y tiempo de extracción, estas técnicas han sido sustituidas por otras más rápidas como MAE o SFE y más recientemente DSPE o MSPD [9-18]

La alta toxicidad de estos compuestos, así como la resistencia a la degradación, hace que sea muy importante establecer la presencia y concentración de los mismos para poder estimar el grado de contaminación de los suelos agrícolas y **la implicación que pueden tener en cuanto a la contaminación de otros medios.**

1. PARTE EXPERIMENTAL.

1.1. PATRONES EMPLEADOS. PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES.

Los compuestos analizados en el desarrollo de esta investigación son los siguientes:

Tabla IV.D.1. Compuestos determinados en suelos agrícolas.

Acetamidas	Acetocloro Alacloro Metazacloro Metolacloro	Piretoides	Bioaletrina Bifentrina Cifenoctrina Cipermetrina λ-cihalotrina Empentrina Permetrina Teflutrina Tetrametrina Transflutrina
	Triazinas y metabolitos		Atrazina DEA DETBA Prometrina Propazina Simazina Terbutrina Terbutilazina
Otros compuestos heterocíclicos		Organofosforados	Clorfenvinfós Clorpirifós Fosalona Metil clorpirifós Metil pirimifós
Triadimefón			

La estructura, propiedades y otros datos útiles acerca de estos pesticidas se incluyen en el anexo I de esta Memoria.

Se han utilizado patrones individuales **acetocloro, alacloro y metil pirimifós y todos los piretroides estudiados**. Para el resto de analitos se utilizaron las mezclas **NE-7500 (triazinas y metabolitos, metazacloro y triadimefón), NE-7555 (organofosforados a excepción del metil pirimifós)** Como subrogado se ha añadido [²H₅]-Atrazina a las muestras antes de extraerlas y se ha utilizado [²H₁₀]-Clorpirifós como patrón interno para realizar los calibrados necesarios. Las soluciones de trabajo se han preparado en su totalidad en acetato de etilo a partir de sucesivas diluciones de las soluciones madre, (preparadas en acetona para el

caso de los piretroides, y en metanol para el resto de compuestos), para formar una mezcla de todos los compuestos a una concentración de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$.

1.2. DESCRIPCIÓN DE LAS ÁREAS MUESTREADAS Y DEL TRATAMIENTO DE MUESTRA

Se han tomado muestras de suelos en **12 parcelas** localizadas en **7 explotaciones ganaderas**. Para que la toma de muestra resultara realmente representativa, se realizó la recogida de muestras mediante una calicata, con un promedio de **9 puntos por Ha** de superficie,

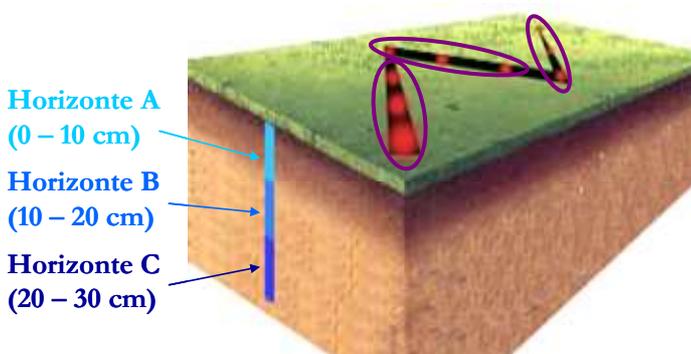


Figura IV.D.1. Descripción del muestreo.

trazando una trayectoria en zig-zag a lo largo de la parcela para poder abarcarla mejor. Para cada uno de los muestreos, se ha utilizado una sonda de 30 cm de profundidad, que se ha dividido en 3 alturas distintas, de **0-10, 10-20 y 20-30 cm** definiendo de esta forma tres horizontes de muestreo.

Esto hace un total de **9 muestras por horizonte**, con tres horizontes muestreados, es decir, **27 muestras por parcela**, a

excepción de una de ellas para la que solamente se tomó muestra en 6 puntos (igualmente a tres profundidades). Por lo tanto, se han tomado un total de 312 muestras.

La búsqueda de la relación entre la presencia de contaminantes en el suelo y las prácticas agrícolas, implicó que se repitiese el muestreo 3 veces a lo largo del año, realizando una toma de muestra en la época de **presiembr**a, otra en la de **postsiembr**a y otra **tras la recogida de los cultivos**. Este procedimiento generó un total de más de 900 muestras. Debido a la imposibilidad de analizar esta gran cantidad de muestras, se agruparon de tres en tres (tal y como se muestra en la figura anterior), obteniendo **9 “muestras conjuntas” por parcela** (tres por cada horizonte de muestreo).

Asimismo durante el muestreo en presiembr

a, se recogió una muestra adicional de cada una de las parcelas para realizar la caracterización del suelo mediante el análisis de textura.

1.2.1. Pretratamiento de muestra.

Las muestras recibidas en el laboratorio se secaron durante dos días a 40°C en ausencia de luz y se separaron las partículas más grandes con un tamiz de malla de 2 mm. Seguidamente se almacenaron en bolsas en el congelador hasta el momento de su análisis, antes del cual el contenido total dichas bolsas fue homogeneizado.

1.2.2. Fortificación de las muestras.

La fortificación se realizó mediante adición de un volumen de 100 µL de una mezcla con todos los compuestos (en acetato de etilo) a la muestra de suelo contenida en un tubo de teflón. Seguidamente se añadió otro volumen igual de disolvente para propiciar una distribución más homogénea de los analitos sobre la matriz e inmediatamente se agitó el tubo mediante ligeros golpes en la base del mismo, que propician la homogeneización del contenido evitando la formación de grumos que suponen una mala distribución del volumen de fortificación añadido. El recipiente que contenía la muestra se dejó en campana durante 30-45 minutos para que la totalidad del disolvente se evaporase, agitando cuidadosamente cada cierto tiempo para propiciar la total evaporación del disolvente.

Tras comprobar que la muestra estaba completamente seca, se llevó a cabo la extracción de los analitos.

1.2.3. Procedimiento de extracción utilizado

Para la extracción de los compuestos en este caso se recurrió a un sistema de microondas “*Ethos 1*” (Milestone), siguiendo un procedimiento que se detalla a continuación.

En el caso de pruebas de optimización y recuperación se pesaron 1,5 gramos de tierra en un tubo de teflón, que se fortificaron con los analitos (si fuera necesario) y con el subrogado, añadiendo un volumen de 100 µL por cada uno.

Transcurrido un tiempo de entre 30-45 minutos, en el que se asegura que la muestra está seca (la tierra está suelta), se añaden 15 mL de una mezcla de hexano:acetona. Los tubos se introducen en el microondas y se realiza la extracción de los analitos aplicando energía de microondas con un método cuyas condiciones se muestran en la tabla IV.D.4. Una vez finalizado el procedimiento de extracción, se recoge el sobrenadante de los tubos con una

pipeta Pasteur y se realiza la limpieza del extracto mediante un filtro de 0,22 μm de teflón, acoplado a un cartucho de SPE.

El extracto recuperado se evapora y se reconstituye con 0,5 mL de acetato de etilo conteniendo el patrón interno si el análisis fuera inmediato, y con 0,45 mL de acetato de etilo si los extractos se congelan a -20°C . En este último caso el volumen de extracto fue compensado con 50 μl del patrón interno preparado en este mismo disolvente justo antes del análisis.

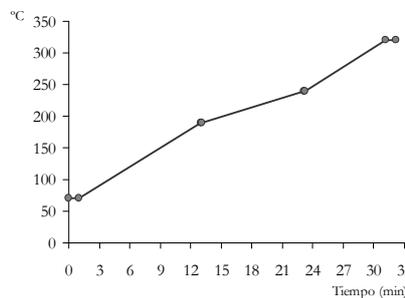
1.3. DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN.

Para la detección y cuantificación de los analitos se utilizó un **cromatógrafo de gases Thermo Fisher Scientific** con un horno cromatográfico (Trace GC Ultra) provisto de un inyector PTV (del inglés *Programmable Temperature Vaporizing*) trabajando en ausencia de división de flujo, y un **espectrómetro de masas Polaris Q de trampa de iones con fuente de ionización externa** con ionización producida por **impacto electrónico** trabajando en modo **SIM y MS/MS**.

Tabla IV.D.2. Condiciones cromatográficas empleadas para la detección de los analitos.

Condiciones Cromatográficas			
Inyector PTV	Modo de inyección		Splitless
	Flujo de split (ml/min)		10
	Tiempo de split (min)		1,70
	Gradiente de temperatura		
	Tiempo (min)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Rampa ($^{\circ}\text{C}/\text{min}$)
	0	70	-
	0,05	70	14,5
	0,29	280	-
1,99	280	-	
2,03	250	14,5	
9	250	-	
13	70	20	
Thermo TR-5ms SQC			
Columna	Fase estacionaria		(5% fenil, 95% dimetil)polisiloxano
	Dimensiones		30m×0,25mm×0,25 μm
Fase móvil	Gas portador		He
	Presión en cabeza de columna (psi)		95
	Flujo de fase móvil (ml/min)		1

Régimen: Gradiente de temperatura			
	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Rampa (°C/min)
Horno	0	70	-
	1	70	-
	13	190	10
	13,1	190	-
	23,1	240	5
	23,2	240	-
	31,2	320	10
	32,2	320	-
Línea de transferencia	320 °C		
DETECTOR			
Modo de ionización	EI		
Flujo de "damping" gas (mL/min)	0,9		
Temperatura de la fuente (°C)	280		
Voltaje del multiplicador (V)	1350		



En todos los casos se inyectaron en el cromatógrafo 4 μL tanto de los patrones de los compuestos (para la realización de rectas de calibrado) como de los extractos, trabajando en todo momento con acetato de etilo ya que, debido a su moderado coeficiente de expansión, permite inyectar mayor volumen en el liner, lo que supone aumentar la sensibilidad analítica en las determinaciones.

El detector de masas trabajando en **SIM** o **MS²** permite realizar un barrido de un gran número de compuestos únicamente limitado por el número máximo de "waveform" permitido en la trampa. Además, cuantos más *scans* se realicen de forma simultánea, menor será la sensibilidad asociada a estas determinaciones, puesto que menor será el tiempo de escaneo para cada uno de los iones (m/z). Es por ello que el método de detección y cuantificación utilizado consta de **16 segmentos**, determinando en cada uno entre 1 y 3 iones m/z , a excepción de dos de ellos en los que hubo que incluir 4 debido a la coelución de varios analitos. Los segmentos se especifican en los anexos que se incluyen al final de la Memoria (Capítulo VI).

2. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

2.1. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS.

A partir de dos métodos cromatográficos desarrollados (uno para piretroides y otro para el resto de analitos) se estimó la viabilidad de realizar la **determinación conjunta de todos los compuestos** con una misma metodología y llevar a cabo un análisis multiresiduo más amplio. Para ello se evaluó la temperatura de columna a la que cada analito apareció eluido, en base a su tiempo de retención y al programa de temperaturas del horno.

El análisis de un patrón preparado en acetato de etilo conteniendo todos los compuestos, mostró la viabilidad de analizar la totalidad de los mismos con un solo cromatograma puesto que no existieron coeluciones y la resolución de los picos cromatográficos fue adecuada. Además, puesto que se trata de familias de compuestos muy distintos, y que los piretroides por lo general se retienen más tiempo en la columna que los organofosforados y las triazinas, se pudo mantener la segmentación aplicada en ambos métodos preliminares con muy pocas variaciones en el número de determinaciones simultáneas por segmento.

Por otra parte, se evaluó la sensibilidad del método al realizar la adquisición en modo SIM y en modo MS/MS. Se eligió para cada caso el modo de detección más adecuado. Para las determinaciones en modo MS² el valor de energía de excitación más favorable para cada uno de los analitos se determinó de forma iterativa, en función de la fragmentación obtenida, y en base a la intensidad de la señal registrada.

Se optimizó también el flujo de “damping gas” en la trampa en el rango de 0,3 a 1,2 ml/min. El valor seleccionado fue 0,9 al proporcionar las mejores respuestas.

El método cromatográfico final se aplicó para la detección y cuantificación de los analitos fijando los parámetros que se muestran en la tabla IV.D.2.

2.2. CONDICIONES DE LA EXTRACCIÓN ASISTIDA POR MICROONDAS.

En base a la bibliografía consultada y a partir de un protocolo establecido para varios pesticidas detallado en una nota técnica de la casa comercial *Milestone*, se decidió aplicar la extracción asistida por microondas a las muestras de tierra, adaptando el protocolo mencionado según la experiencia adquirida previamente. Se estudió el efecto de los parámetros: **tiempo de extracción, efecto de agitación, temperatura de extracción y proporción relativa de la mezcla de extracción** (hexano:acetona).

En todos los casos se aplicó el procedimiento a 1,5 g de muestra y se utilizó florisil para realizar la limpieza de los extractos.

Tabla IV.D.3. Parámetros evaluados en la puesta a punto del método de extracción asistida por microondas.

Parámetros	Niveles de estudio		
Tiempo de extracción (min)	5	15	20
Temperatura de extracción	100	120	140
Proporción relativa de hexano:acetona (v/v)	1:1		2:1
Agitación magnética	Con agitación		Sin agitación

En base a los resultados obtenidos, las condiciones que se fijaron para el método de extracción fueron las siguientes.

Tabla IV.D.4. Condiciones de extracción de los analitos en muestras de tierra.

Cantidad de muestra (g)	1,5	
Volumen de extracción (mL)	15	
Mezcla de extracción (v/v)	Hexano:acetona (1:1)	
Tiempo de extracción (min)	15	

Programa de temperaturas	Tiempo (min)	Temperatura (°C)
	0	Ambiente
	10	100
	15	100
	35	Ventilación

Tiempo (min)	Temperatura (°C)
0	20
10	100
25	100

Una vez fijadas las condiciones de extracción, se evaluó que cartucho fue más adecuado para llevar a cabo la SPE, etapa necesaria para eliminar las interferencias presentes en la muestra. Se realizaron pruebas con cartuchos de C₁₈, alúmina, sílica y florisil, siendo este último el que proporcionó los mejores resultados en cuanto a recuperaciones.

2.3. PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO.

Este estudio se ha planteado en la dirección de evaluar el contenido de contaminantes en los suelos y posteriormente **establecer un perfil de concentraciones hasta una profundidad de 30 centímetros**.

Para ello, se ha supuesto que los **muestreos en presiembra** deberían de ser los que presentaran menos carga de residuos puesto que se correspondían con muestras que habían sido tomadas antes de la aplicación directa de fitosanitarios en el año de muestreo.

Se ha realizado la **caracterización** de cada uno de los suelos de las 12 parcelas en base a su **textura** (USDA), y se ha evaluado el contenido de **materia orgánica de cada uno de los horizontes** (0-10, 10-20 y 20-30 cm). Para ello se han generado 3 submuestras por cada parcela, que surgen de combinar las 9 muestras por cada horizonte, por lo que el número total de determinaciones en cuanto a materia orgánica ha sido de 36.

Tabla IV.D.5. Caracterización de cada uno de los suelos por textura y materia orgánica evaluada para los horizontes de cada suelo.

Muestra	Textura	Horizonte	%MO	Muestra	Textura	Horizonte	%MO
1	Franco-arenoso	A	19,6	7	Franco	A	10,2
		B	17,4			B	9,9
		C	14,9			C	8,1
2	Franco-arenoso	A	19,9	8	Franco	A	17,0
		B	19,1			B	17,5
		C	16,1			C	14,2
3	Franco-arenoso	A	12,4	9	Franco	A	15,3
		B	13,2			B	14,5
		C	11,4			C	13,0

Muestra	Textura	Horizonte	%MO	Muestra	Textura	Horizonte	%MO
4	Franco-arenoso	A	19,1	10	Franco-arenoso	A	20,1
		B	18,8			B	15,7
		C	11,9			C	9,8
5	Franco-arenoso	A	10,8	11	Franco-arenoso	A	10,1
		B	12,3			B	9,8
		C	10,4			C	5,5
6	Franco-arenoso	A	20,5	12	Franco-arenoso	A	14,7
		B	17,5			B	14,1
		C	8,8			C	11,5

El estudio de la textura mostró que 9 de los suelos fueron de tipo **franco-arenoso** y en 3 casos la textura fue de tipo **franco**. Los contenidos en materia orgánica fueron elevados, registrándose valores entre 9 y 20%. De entre todas las parcelas, se tomaron 3 como representativas de todo el conjunto, seleccionándose de acuerdo con los niveles de materia orgánica y con las texturas. De esta forma, se decidió trabajar con las muestras **1 y 5** para la categoría franco-arenoso y la muestra **9** para la categoría franco, lo que generó un total de 9 submuestras

2.4. DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN DE LOS PESTICIDAS EN LOS SUELOS AGRÍCOLAS.

Aplicando el método de extracción puesto a punto a 8 de las muestras*, se determinó el porcentaje de recuperación de los pesticidas con la metodología propuesta. La evaluación se realizó con el método de “*matrix matched standard*” (recta de adición de matriz) por lo que se logró suprimir el efecto matriz que pudiera presentar cualquier muestra.

Para este estudio se fortificaron cada una de las 8 submuestras por triplicado adicionando los compuestos a la cantidad de tierra a extraer, para lograr una concentración en muestra de 15 ng g^{-1} , lo que supondría extractos de 40 ng mL^{-1} en caso de extracción cuantitativa de los compuestos.

* El estudio se realizó con las 9 submuestras, pero un problema con el filamento del detector obligó a parar las analíticas a falta del horizonte C de la parcela 5 por analizar, por lo que no se incluye en este apartado.

Para poder tener una visión global de todo el estudio de recuperación, se muestran para cada uno de los compuestos, **agrupados por familia química**, dos conjuntos de barras. Éstos están formados por un grupo de 5 valores, correspondientes al porcentaje de recuperación obtenido para los horizontes de las parcelas con textura franco-arenosa, y otra agrupación de 3 barras correspondientes a las submuestras pertenecientes a la parcela de tipo franco.

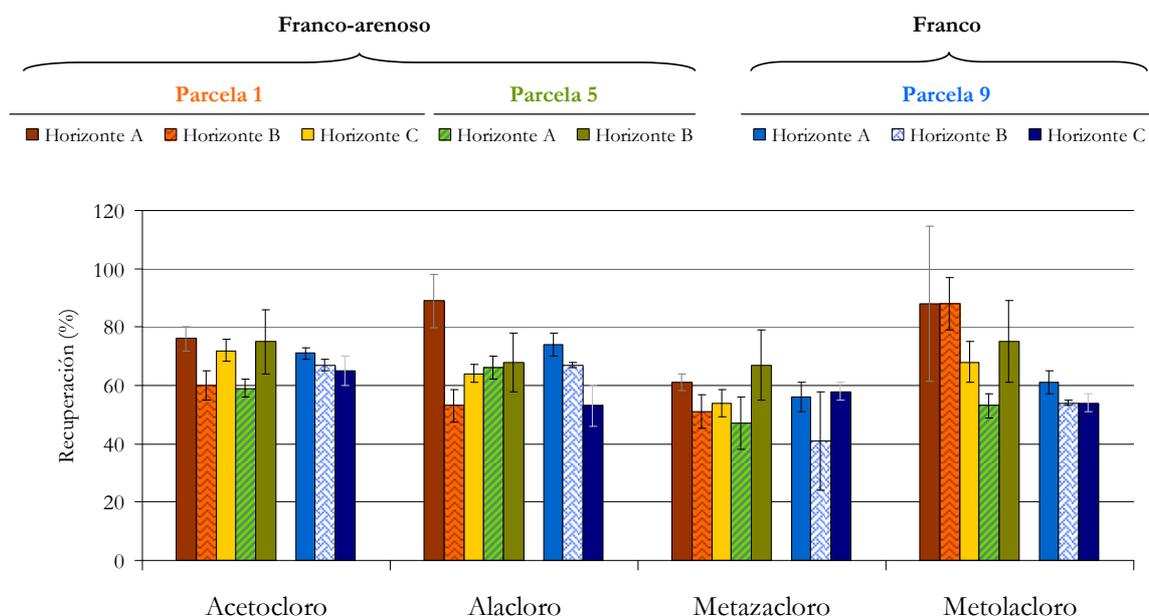


Figura IV.D.2. Recuperaciones obtenidas para las acetanilidas en cada una de las submuestras de las 3 parcelas analizadas.

Como se puede apreciar, las 4 cloroacetanilidas siguen la misma tendencia, con recuperaciones alrededor de 60% para las muestras de textura franco (barras azules), y valores que varían un poco más entre los distintos horizontes para las muestras de textura franco-arenoso, registrando recuperaciones en muchos casos superiores o muy cercanas a 70 %. El porcentaje de recuperación del metolacloro es claramente más bajo en los horizontes del tipo franco.

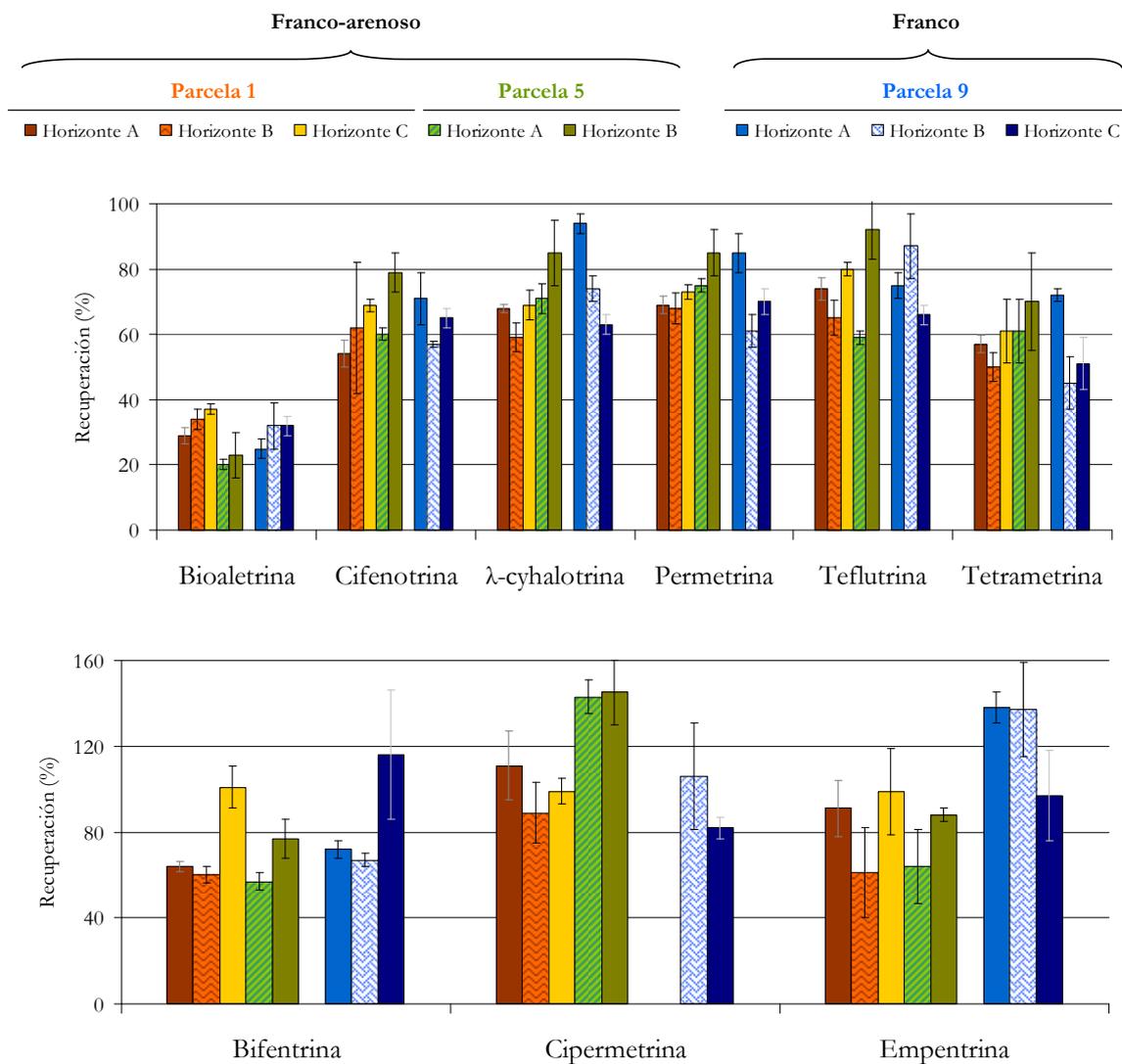


Figura IV.D.3. Recuperaciones obtenidas para los piretroides en cada una de las submuestras de las 3 parcelas analizadas.

El comportamiento de los piretroides muestra una cierta tendencia común, lográndose recuperaciones más altas al aumentar la profundidad del horizonte en las parcelas 1 y 5, de

carácter franco-arenoso. Sin embargo, para la parcela 9 (franco) la tendencia observada en las respuestas no es tan clara. Globalmente, los porcentajes de recuperación de los piretroides son superiores a 70 %, salvo para la bioaletrina.

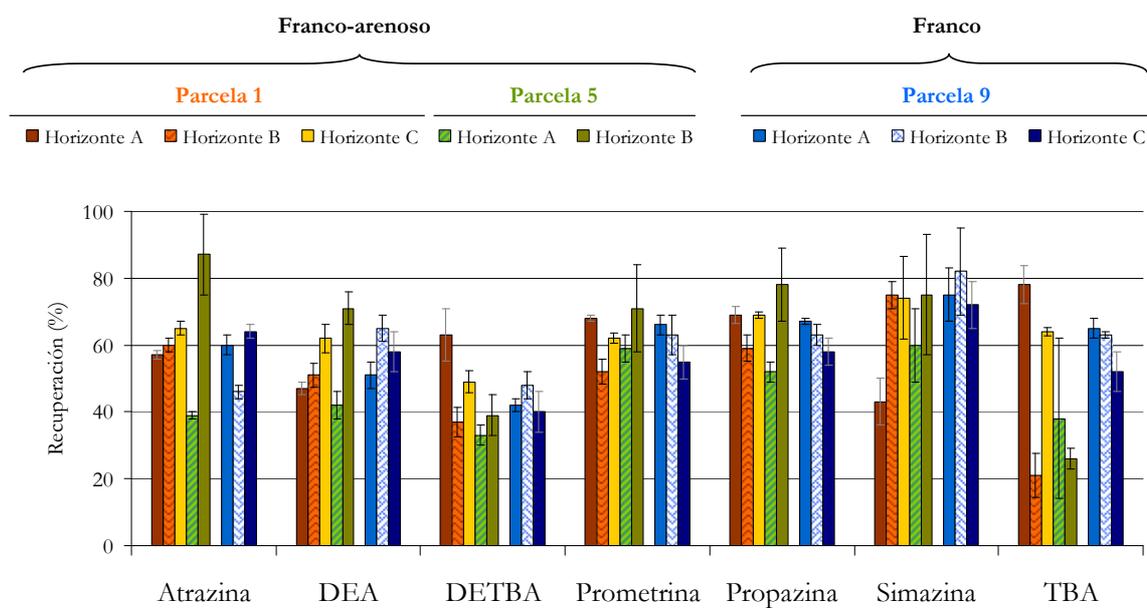


Figura IV.D.4. Recuperaciones obtenidas para las triazinas en cada una de las submuestras de las 3 parcelas analizadas.

En el caso de propazina y TBA, los horizontes de textura franco proporcionan recuperaciones algo mayores para aquellas submuestras que presenta una mayor materia orgánica. Esta tendencia se invierte en los horizontes de textura franco-arenosa para atrazina, DEA y simazina. Para muchos de los analitos, los valores de recuperación son del mismo orden con ambas texturas, llegando a los 70 % para la simazina y la propazina.

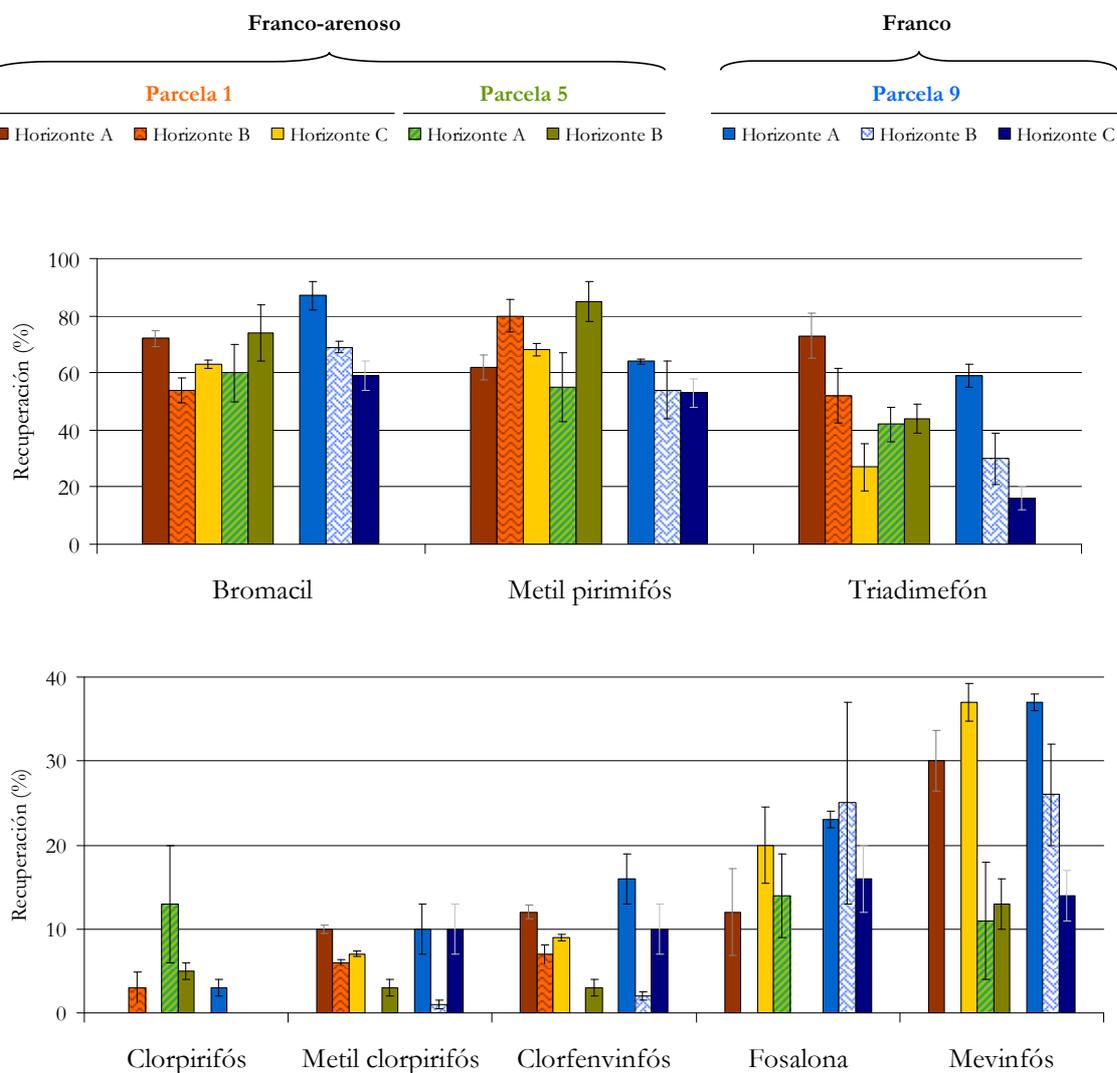


Figura IV.D.5. Recuperaciones obtenidas para los organofosforados en cada una de las submuestras de las 3 parcelas analizadas.

Por último, para tres de los organofosforados, bromacil, metil pirimifós, y triadimefón, se obtuvieron recuperaciones que en algunos casos superaron el 70%. En estos casos, las submuestras pertenecientes a la parcela de textura franco proporcionaron mejores respuestas en los horizontes más superficiales, mientras que no se observó ninguna tendencia general para las submuestras de carácter franco-arenoso. Este comportamiento lo comparte también el mevinfós, para el cual las recuperaciones fueron notablemente menores. Para los otros organofosforados presentes en la gráfica no se recuperó apenas compuestos en los ensayos.

2.5. ESTIMACIÓN DE LOS LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

Se evaluaron los LODs y LOQs del método desarrollado. El cálculo se llevó a cabo extrapolando el valor de relación entre la señal y el ruido (s/n) de los picos obtenidos tras el análisis de un punto bajo de la recta de adición de matriz para la submuestra “9- Horizonte A”. Se estableció para el cálculo del LOQ realizar la extrapolación hasta un valor de $s/n = 10$, y de $s/n = 3$ para el LOD. Dichos límites se estimaron considerando picos cromatográficos cuya s/n no fuera superior a 200, y se aseguró que el valor derivado de la extrapolación no fuese nunca inferior a 1000 cuentas de área para el cálculo del LOQ.

De esta forma se calculan los valores que se adjuntan en la tabla IV.D.6., en donde se presentan referidos a la muestra de tierra por unidad de masas.

Tabla IV.D.6. LODs y LOQs establecidos para los 28 compuestos estudiados.

Pesticidas	LOQ (ng/g)	LOD (ng/g)
Acetocloro	1,3	0,4
Alacloro	0,9	0,3
Atrazina	0,9	0,3
Bifentrina	0,9	0,3
Bioaletrina	5,2	1,6
Cifenoctrina	2,3	0,7
Cipermetrina	12,6	3,8
Clorfenvinfós	4,3	1,3
Clorpirifós	4,3	1,3
DEA	1,6	0,5
DETBA	1,2	0,4

Pesticidas	LOQ (ng/g)	LOD (ng/g)
Empentrina	10,3	3,1
Fosalona	1,7	0,5
λ -Cihalotrina	1,9	0,6
Metazacloro	5,7	1,7
Metil clorpirifós	3,8	1,1
Metil pirimifós	1,0	0,3
Metolacloro	1,1	0,3
Permetrina	1,2	0,4
Prometrina	1,9	0,6
Propazina	1,0	0,3
Simazina	2,8	0,9
Teflutrina	1,3	0,4
Terbutilazina	1,1	0,3
Terbutrina	1,1	0,3
Tetrametrina	1,6	0,5
Transflutrina	11,3	3,4
Triadimefón	1,1	0,3

Los límites de cuantificación del método se encuentran en la zona de la baja parte por billón, estableciéndose en un rango de 1 a 13 ng g⁻¹, si bien para la mayoría de los compuestos los **LODs** fueron **inferiores a 4 ng g⁻¹**. Los compuestos menos “sensibles” resultaron ser algunos piretroides y organofosforados. Consecuentemente, el **LOD** se estableció en niveles entre 0,3 y 4 ng g⁻¹, siendo más comunes los valores **por debajo de la parte por billón**.

2.6. INFLUENCIA DEL CONTENIDO DE MATERIA ORGÁNICA SOBRE LAS RESPUESTAS ANALÍTICAS DE LOS COMPUESTOS POR GC-MS/MS

Se ha realizado un estudio para evaluar el efecto matriz de las 3 submuestras de cada una de las parcelas seleccionadas. Para ello se han comparado las **pendientes** obtenidas a partir de un **triplicado de la recta de calibrado** con la obtenida a partir de una **recta de adición** (*matrix matched standard*) preparada con un 40% de presencia de matriz, ambas en el

rango de concentración de 3 a 300 ng mL⁻¹. Se han analizado por lo tanto **9 rectas de adición**, una para cada uno de los horizontes de las parcelas 1, 5 y 9.

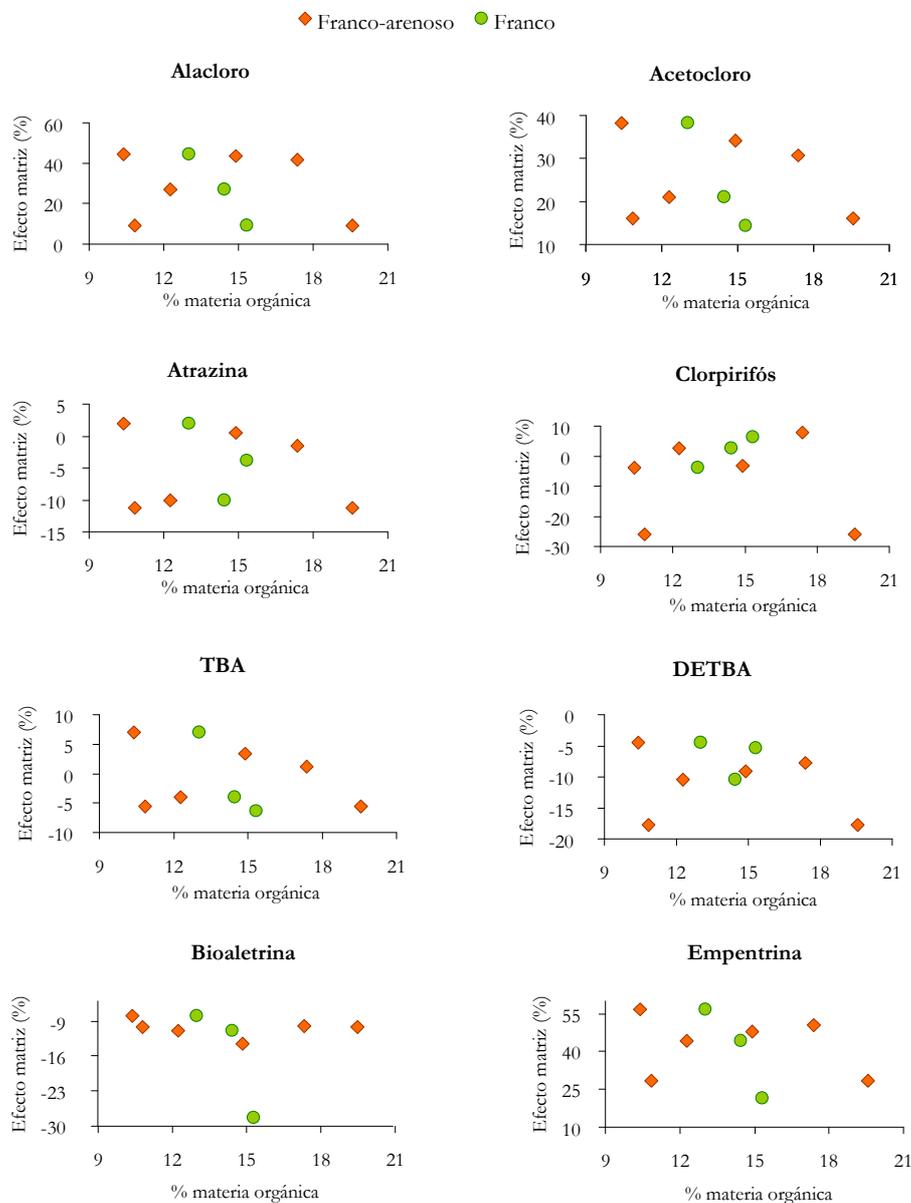


Figura IV.D.6. Gráficas de efecto matriz registrado para cada una de las submuestras en función de su % de materia orgánica y de la textura de la parcela muestreada.

Se ha intentado establecer un **patrón de comportamiento** sobre el **aumento o supresión de señal** en función del **porcentaje de materia orgánica** de la submuestra analizada, teniendo en cuenta también la **textura** de la parcela de la que proviene.

Las gráficas anteriores muestran el porcentaje de supresión/aumento de señal registrado para ocho de los compuestos evaluados, representativos de la gran mayoría de los estudiados.

Lo primero que se puede deducir de estas gráficas es que, salvo acetocloro, alacloro y empenrina, se ha observado una tendencia al aumento del efecto matriz con el aumento de materia orgánica, produciéndose un incremento de la supresión de señal observada.

Por otra parte, aunque los perfiles puedan parecer similares, el rango de variación de los efectos va desde un 20% (las triazinas por ejemplo) a un 60%, y para alguno de los piretroides se registraron datos de aumento de señal muy superiores.

Para clorpirifós y bioaletrina se observa (a excepción de dos puntos) que los efectos de matriz son estables con la materia orgánica. Este comportamiento lo comparten la gran mayoría de los piretroides y algunos organofosforados, si bien en estos casos el efecto matriz se mantiene en un porcentaje más alto.

Sin duda, habría que introducir más puntos para tener un conjunto de respuestas más amplio y poder deducir tendencias claras, sobre todo para las muestras de tipo franco. Además, el rango de porcentajes de materia orgánica que se ha estudiado es bastante estrecho, ya que, a pesar de que se llega a valores altos, en ningún caso se ha evaluado el comportamiento por debajo de un valor de materia orgánica de 9%.

2.7. DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE PESTICIDAS EN LAS 36 MUESTRAS DE SUELO RECOGIDAS EN EL PERIODO DE PRE-SIEMBRA.

Se ha llevado a cabo el análisis de las muestras recogidas, formando **una submuestra para cada uno de los horizontes estudiados**. Por lo tanto se han analizado 36 “muestras conjuntas”, tres por cada una de las parcelas. Los valores de concentración se han estimado a partir de las rectas de adición de matriz de cada uno de los horizontes evaluados en el capítulo anterior. Para el resto de submuestras, aquellas de textura franco-arenoso, se cuantificaron en base a una de las rectas de adición de los horizontes de las parcelas 1 y 5, mientras que para las muestras de tipo franco, se han utilizado las tres rectas de adición de matriz correspondientes a los horizontes de la parcela 9. En cualquiera de los casos, se ha decidido **cuantificar los picos cromatográficos en base a la recta de adición de la submuestra que presentara una materia orgánica más parecida, respetando siempre el tipo de suelo en cuanto a textura**.

Tabla IV.D.7. Concentraciones calculadas para las 12 parcelas por cada uno de los horizontes (HA, HB y HC, de menor a mayor profundidad).

		Acetocloro	Alacloro	Atrazina	Clorpirifós	DETBA	Metolacloro	Propazina	TBA
1	HA	4,7	3,0				28,5		
	HB	4,2	2,9	5	< loq		65,1		1,3
	HC						3,2		
2	HA	122,4	2,4	36,8	12,5				
	HB	3,6	4,8	5,7	21,5				
	HC	3,7							
3	HA	13,9	1,4			3,5			12,2
	HB	8,0	5,6	8,7					< loq
	HC								< loq
4	HA	66,3	20,6	45,5	20,9			< loq	
	HB	6,5	10,8	8,3					
	HC	3,8							
5	HA		1,0						
	HB	2,1							< loq
	HC						< loq		
6	HA	30,6	19,8			27,5			96,3
	HB	2,1	7,4						< loq
	HC	2,4							1,3

		Acetocloro	Alacloro	Atrazina	Clorpirifós	DETBA	Metolacloro	Propazina	TBA
7	HA	2,8				4			4,7
	HB								
	HC								
8	HA	6,1	4,8	13,6	5,0				
	HB	3,8	7,2	4,0					
	HC			2,1					
9	HA								
	HB	2,1	3,3						
	HC								
10	HA	49,4	11,1	28,5	24,1			< loq	
	HB	2,3	3,9	2,3					
	HC								
11	HA	1,7							
	HB	4,6	3,9						< loq
	HC	5,4	2,8		< loq				7,2
12	HA								
	HB	3,6	7,2	3,0	< loq				< loq
	HC	7,3	7,4	2,6	6,1				10,6
Concentración mediana		4,0	4,8	5,7	14,7	4,0	34,2		7,2
Concentración media		14,6	6,3	12,8	13,1	11,7	32,3		19,2

El análisis de los extractos de las muestras reveló la **existencia de residuos de pesticidas en todos los horizontes de las tierras**. De acuerdo con lo esperado en base a la aplicación de fitosanitarios en el año anterior al muestreo, los compuestos determinados en un mayor número de ocasiones fueron acetocloro, alacloro y atrazina, que presentan una concentración media entre las 12 parcelas de 14,6, 6,3 y 12,8 ng g⁻¹ respectivamente.

Para muchas de las parcelas, se puede observar un acusado descenso en las concentraciones estimadas al descender en profundidad en el muestreo. Por ejemplo, el horizonte A (HA = 0-10 cm) para acetocloro en la muestra 2 presenta un valor de concentración que desciende drásticamente al pasar a horizontes más profundos, al igual que ocurre para la parcela 4, 6 o 10.

Para las parcelas 3, 6 y 7, se detectaron residuos de terbutilazina (TBA) y su metabolito DETBA, a unos niveles notablemente superiores al resto para el caso de la parcela 6.

Solamente para la parcela 12 se observa que los analitos fueron detectados en los horizontes más profundos sin detectarse en el superficial. Es precisamente este tipo de perfil que pensábamos encontrar con más frecuencia en estas muestras recogidas en el periodo de pre-siembra y de pre-aplicación de pesticidas.

A excepción del valor máximo de concentración registrado para acetocloro ($122,4 \text{ ng g}^{-1}$) el resto de valores no superaron los 100 ng g^{-1} , siendo en la mayoría de los casos inferiores a 40 ng g^{-1} . En algunas ocasiones se detectó el compuesto a un nivel inferior al límite de cuantificación, por lo que se puede afirmar que los valores encontrados en las muestras no fueron indicativos de un alto nivel de contaminación. No obstante, teniendo en cuenta que estas muestras estuvieron tomadas en la época de pre-siembra (mes de abril), se puede concluir que las concentraciones evaluadas se corresponden con **cantidades residuales** de pesticidas aplicados los años anteriores en las parcelas.

A continuación se muestran los cromatogramas reconstituídos con los filtros de MS² o SIM para los compuestos detectados en la muestra de la parcela 3, horizonte A,

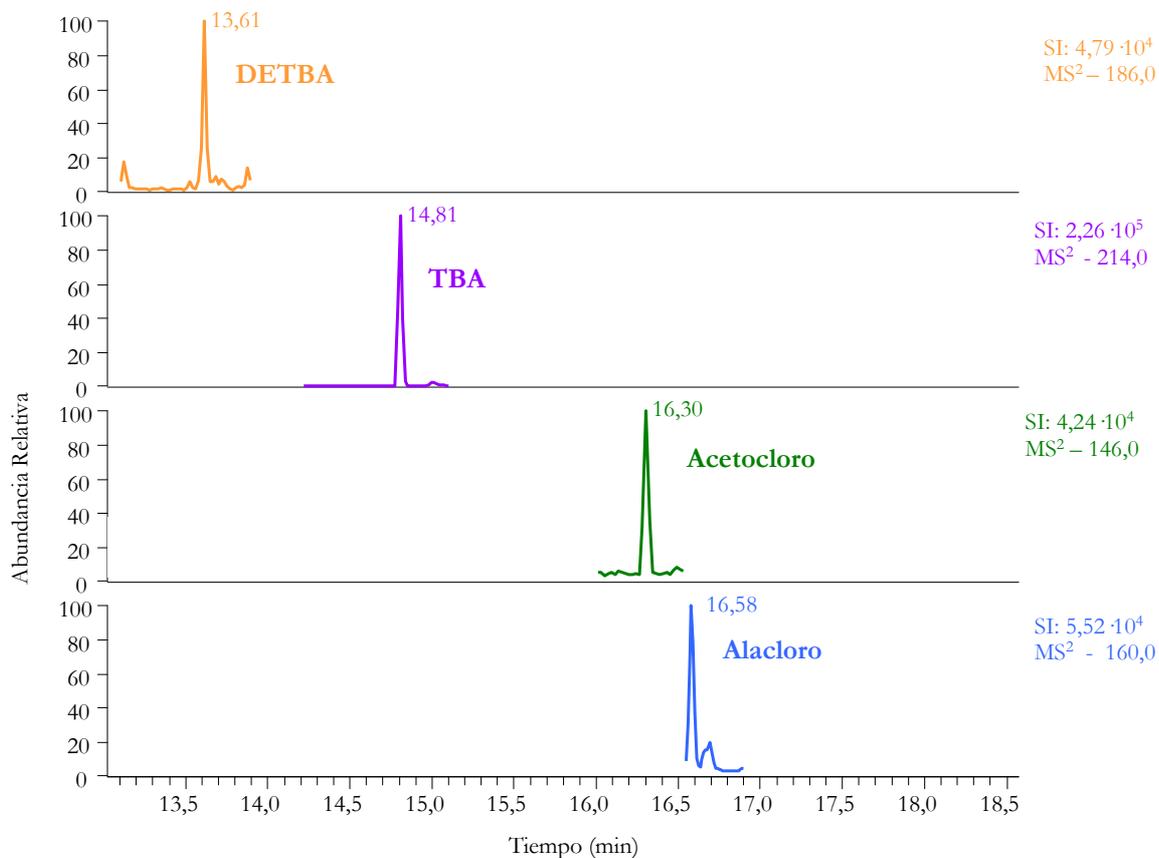


Figura IV.D.7. Cromatogramas de la muestra correspondiente al horizonte A de la parcela 3 para aquellos compuestos que estuvieron presentes en la muestra.

3. BIBLIOGRAFÍA.

[1] Arora, S.; Mukherjee, I.; Trivedi, T.P. Determination of pesticide residue in soil, water and grain from IPM and non-IPM field trials of rice. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **2008**, *81*, pp. 373-376.

[2] Rissato, S.; Galhiane, M.; Apon, B.; Arruda, M. Multiresidue analysis of pesticides in soil by supercritical fluid extraction/gas chromatography with electron-capture detection and confirmation by gas chromatography-mass spectrometry; *J. Agric. Food Chem.*; **53**, **2005**, pp. 62-69.

[3] Hilber, I.; Mader, P.; Schulin, R.; Wyss, G.S. Survey of organochlorine pesticides in horticultural soils and there grown Cucurbitaceae. *Chemosphere*, **2008**, *73*, pp. 954-961.

[4] Tao, S.; Liu, W.; Li, Y.; Yang, Y.; Zuo, Q.; Li, B.; Cao, J.; Organochlorine pesticides contaminated surface soil as reemission source in the Haihe Plain, China; *Environ. Sci. Technol.*; **42**, **2008**, pp. 8395-8400.

[5] Arias-Estévez, M.; López-Periago, E.; Martínez-Carballo, E.; Simal-Gándara, J.; Mejuto, J.; García-Río, L.; The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources; *Agric. Ecosyst. Environ.*; **123**, **2008**, pp. 247-260.

[6] Wong, F.; Alegria, H.; Bidleman, T.; Organochlorine pesticides in soils of Mexico and the potential for soil - air exchange; *Environ. Pollut.*; **158**, **2010**, pp. 749-755.

[7] Yang, Y.; Zhang, N.; Xue, M.; Tao, S.; Impact of soil organic matter on the distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soils, *Environ. Pollut.*; **158**, **2010**, pp. 2170-2174.

[8] Sánchez-Brunete, C.; Albero, B.; Tadeo, J.; Multiresidue determination of pesticides in soil by gas chromatography- Mass spectrometry detection; *J. Agric. Food Chem.*; **52**, **2004**, pp.1445-1451.

[9] Fernandez-Alvarez, M.; Llompart, M.; Lamas, J.; Lores, M.; Garcia-Jares, C.; Cela R.; Dagnac, T.; Simultaneous determination of traces of pyrethroids, organochlorines and other main plant protection agents in agricultural soils by headspace solid-phase microextraction-gas chromatography. *J Chromatogr A*; **1188**, **2008**, pp.154-63.

[10] Fuentes, E.; Báez, M.; Reyes, D.; Microwave-assisted extraction through an aqueous medium and simultaneous cleanup by partition on hexane for determining pesticides in agricultural soils by gas chromatography: A critical study; *Anal. Chim. Acta*, 578, **2006**, pp 122-130.

[11] Esteve-Turrillas, F.A.; Aman, C.S.; Pastor, A.; de la Guardia, M.; Microwaveassisted extraction of pyrethroid insecticides from soil; *Anal. Chim. Acta*;522, **2004**, pp. 73-78.

[12] Hildebrandt,A.; Lacorte, S.; Barceló, D.; Assessment of priority pesticides, degradation products, and pesticide adjuvants in groundwaters and top soils and pesticide adjuvants in groundwaters and top soils from agricultural areas of the Ebro river basin; *Anal. Bioanal. Chem.*; 387, **2007**, pp. 1459-1468.

[13] Drożdżyński, D.; Kowalska, J.; Rapid analysis of organic farming insecticides in soil and produce using ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry; 394, **2009**, pp. 2241-2247.

[14] Andreu, V.; Picó, Y.; Determination of pesticides and their degradation products in soil: critical review and comparison of methods; *TrAC, Trends Anal. Chem.*; 23, **2004**, pp. 772-789

[15] Belmonte, A.; Garrido, A.; Martínez, L.; Monitoring of pesticides in agricultural water and soil samples from Andalusia by liquid chromatography coupled to mass spectrometry; *Anal. Chim. Acta*; 538, 2005, pp. 117-127.

[16] Oldal, B.; Maloschik, E.; Uzinger, N.; Anton, A.; Székács, A.; Pesticide residues in Hungarian soils *Geoderma*; 135, **2006**, pp. 163-178.

[17] Dagnac, T.; Bristeau, S.; Jeannot, R.; Mouvet, C.; Baran, N.; Determination of chloroacetanilides, triazines and phenylureas and some of their metabolites in soils by pressurised liquid extraction, GC–MS/MS, LC–MS and LC–MS/MS; *J. Chromatogr. A*, 1067, **2005**, pp. 225-233.

[18] Asensio-Ramos, M.; Hernández-Borges, J.; Borges-Miquel, T.; Rodríguez-Delgado, M.; Evaluation of multi-walled carbon nanotubes as solid-phase extraction adsorbents of pesticides from agricultural, ornamental and forestal soils; *Anal. Chim. Acta*, 647, **2009**, pp. 167-176

CAPÍTULO IV.E. ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS PRESTACIONES DEL EQUIPO EN MODO SRM Y SRM+QED.

Se ha realizado un estudio comparativo para la adquisición en modo **SRM** y en modo simultáneo **SRM+QED** con el que se ha podido evaluar las prestaciones del equipo en ambos modos de detección. De esta forma se ha evaluado la capacidad real del equipo para cuantificar compuestos y adquirir sus espectros de MS/MS de forma simultánea.

1. PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO.....	- 283 -
2. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS.....	- 284 -
3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	- 285 -

1. PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO.

El modo de adquisición simultáneo SRM+QED es muy útil para la confirmación de presencia de compuestos. Tal y como se puede ver en la figura IV.E.1, en donde se muestra un cromatograma obtenido en modo QED así como el espectro de MS² generado para dos de los compuestos estudiados, cualquiera de los espectros presenta gran cantidad de fragmentos, lo que lo convierte en una importante arma para identificar los picos cromatográficos.

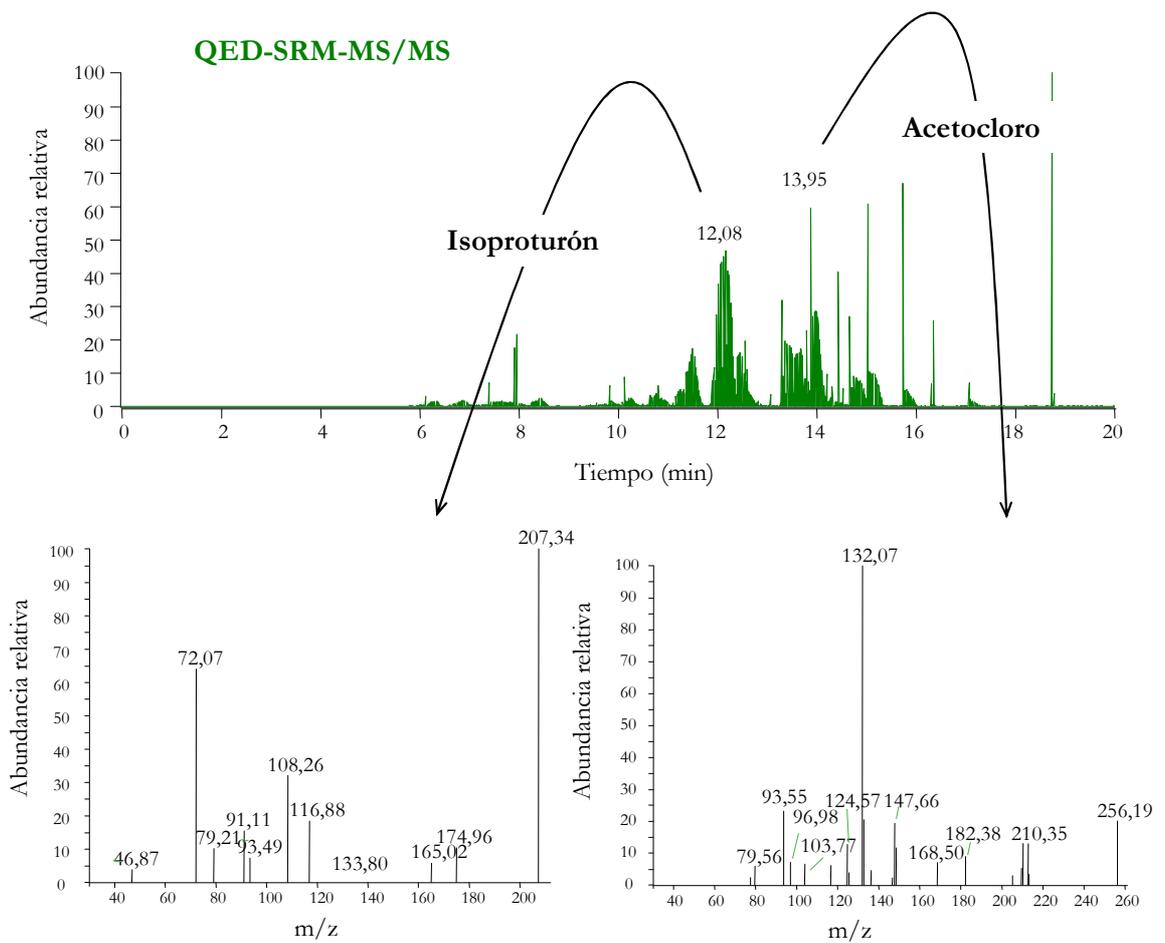


Figura IV.E.1. Cromatograma en TIC y espectros de MS² obtenidos para la adquisición en modo SRM+QED para un patrón de 10 ng mL⁻¹ preparado en metanol.

Hay que tener en cuenta que un pico ha de estar definido por un número mínimo de puntos, lo cual depende de los **ciclos de escaneo**, que serán más largos cuanto mayor sea el número de compuestos a determinar. Hay dos factores que influyen en este aspecto: el **tiempo de escaneo** y el **ancho de escaneo**, que dependen de las condiciones de análisis estipuladas por el usuario.

En el modo de escaneo simultáneo QED+SRM, la adquisición en modo full MS² implica disminuciones en la frecuencia de los ciclos de escaneo y, en consecuencia, en el número de puntos por pico, con respecto al modo SRM.

Se realizó un estudio de comparación entre SRM y SRM+QED para varios de los compuestos estudiados en esta Tesis en base al número de **puntos determinados por cada pico** cromatográfico, obtenidos al variar el **tiempo de escaneo** y el **número de transiciones** a adquirir.

2. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS.

Para realizar el estudio se utilizó un patrón de calibrado de 10 ng mL⁻¹ preparado en metanol conteniendo todos los compuestos analizados en el apartado anterior (Agua de río), de los cuales se han seleccionado 6: atrazina, clorfenvinfós, metil pirimifós, metolacloro, prometrina y terbutrina.

Las determinaciones se llevaron a cabo bajo las siguientes condiciones de análisis.

Tabla IV.E.1. Condiciones cromatográficas empleadas para la separación y detección de los analitos.

COLUMNA		
Symmetry Shield (Waters)	Fase estacionaria	C ₁₈
	Dimensiones	150×2,1mm
	Tamaño de partícula	3 µm
	Tamaño de poro	100 Å
FASE MÓVIL		
Régimen	Gradiente	
A	Agua tamponada con ácido fórmico al (0,15%) y formiato amónico (3mM)	
B	Metanol "tamponado" con ácido fórmico al (0,15%) y formiato amónico (3mM)	
Flujo	200 µL min ⁻¹	
T ^a	25°C	

Gradiente de fase móvil	Tiempo (min)	% H ₂ O	% MeOH
	0	70	30
	1	70	30
	15	10	90
	17	10	90
	23	70	30
	26	70	30

DETECTOR	
Modo de ionización	Positivo
Voltaje del spray (V)	3800
T ^a del vaporizador (°C)	200
T ^a del capilar (°C)	350
Gas de impulsión (u.a.) ¹	35
Gas auxiliar (u.a.)	4
Voltaje del <i>skimmer offset</i> (V)	4
Tiempo de escaneo (ms)	5
Cono de barrido de iones	4

El número de transiciones fijadas fueron **35, 70, 105 y 138** y se adquirieron en su totalidad **con un solo segmento** en el método de análisis. Las 35 transiciones iniciales se mantuvieron en todos los casos para poder realizar la evaluación de parte de los compuestos definidos por éstas.

3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

La representación de los puntos que definen cada uno de los picos cromatográficos con respecto al número de transiciones adquiridas en cada caso, da una idea de la tendencia de la respuesta y de la variación en la capacidad de detección en función del tiempo de escaneo y el modo de detección seleccionado.

Los puntos se ajustaron a una función exponencial que define el número de puntos por pico en base a la cantidad de transiciones evaluadas. Como es lógico, cuantas menos transiciones se detecten simultáneamente, los ciclos de escaneo serán más cortos y más frecuentes y se obtendrán más puntos por pico.

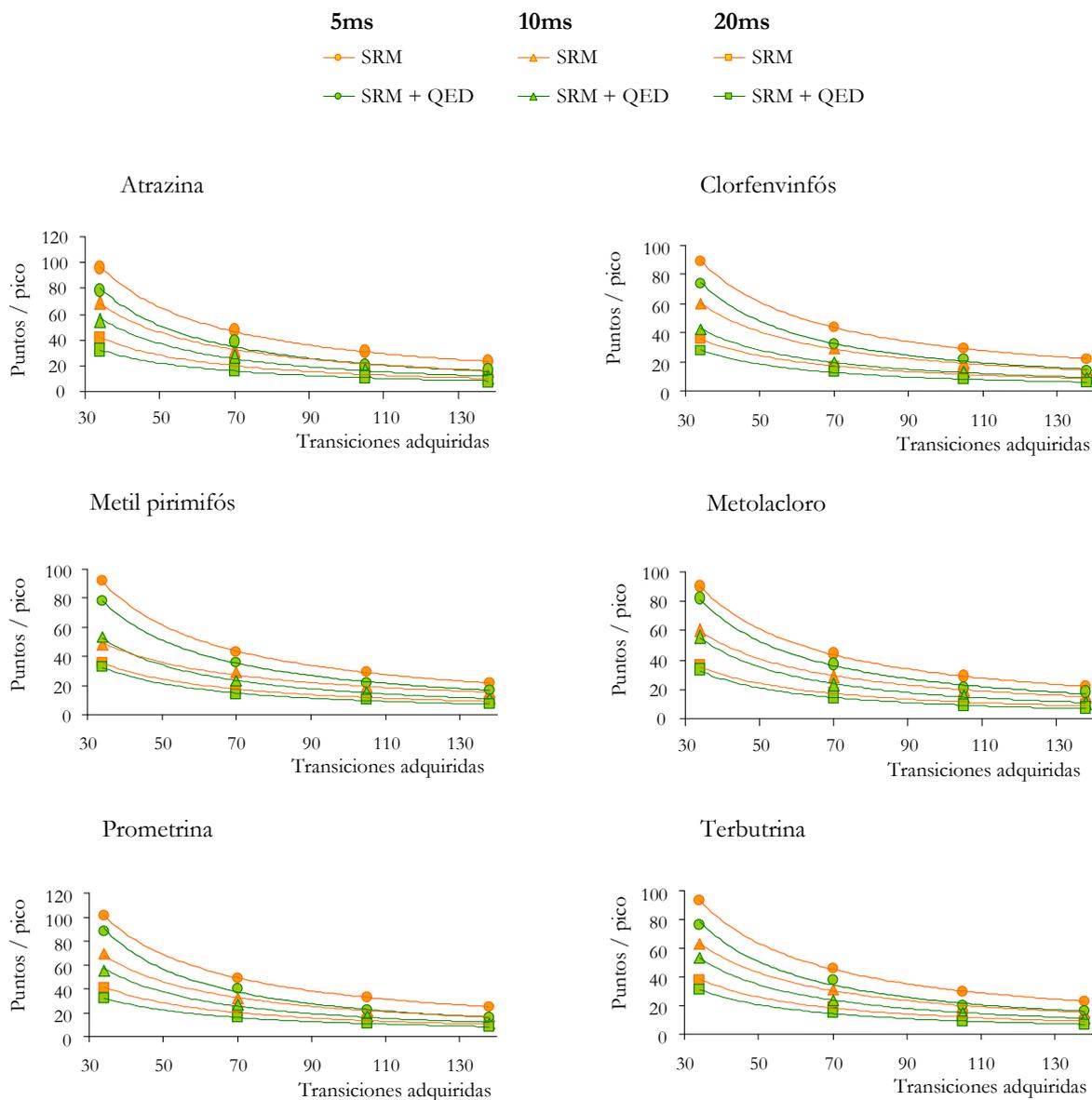


Figura IV.E.2. Puntos determinados por pico cromatográfico para 4 compuestos en función del tiempo de escaneo y del número de transiciones adquiridas.

Tabla IV.E.2. Ecuaciones y coeficiente de regresión para atrazina (1), clorfenvinfos (2), metil pirimifos (3), metolaclor (4), prometrina (5) y terbutrina (6)

	SRM			SRM+QED		
	5 ms	10 ms	20 ms	5 ms	10 ms	20 ms
1	$y = 3481,7x^{-1,0162}$	$y = 2360,1x^{-1,0247}$	$y = 1290,5x^{-1,0064}$	$y = 4851x^{-1,163}$	$y = 2934,5x^{-1,0064}$	$y = 1397,8x^{-1,0766}$
	$R^2 = 0,9996$	$R^2 = 0,9996$	$R^2 = 0,9999$	$R^2 = 0,9897$	$R^2 = 0,9999$	$R^2 = 0,9977$
2	$y = 3019,4x^{-0,9979}$	$y = 2322,9x^{-1,0346}$	$y = 1236,2x^{-1,0064}$	$y = 4372,3x^{-1,1542}$	$y = 1960,7x^{-1,0848}$	$y = 1392,1x^{-1,1054}$
	$R^2 = 0,9998$	$R^2 = 0,9996$	$R^2 = 0,9973$	$R^2 = 0,9934$	$R^2 = 0,9974$	$R^2 = 0,9994$
3	$y = 3334,9x^{-1,0202}$	$y = 941,54x^{-0,8354}$	$y = 1135,4x^{-0,9818}$	$y = 3780x^{-1,0996}$	$y = 2725,5x^{-1,1195}$	$y = 1497,8x^{-1,0868}$
	$R^2 = 0,9997$	$R^2 = 0,9918$	$R^2 = 0,9987$	$R^2 = 0,999$	$R^2 = 0,9997$	$R^2 = 0,9956$
4	$y = 3136,8x^{-1,0061}$	$y = 1919,1x^{-0,9837}$	$y = 1236,2x^{-1,0064}$	$y = 4245,3x^{-1,1213}$	$y = 3289,5x^{-1,1597}$	$y = 1660,2x^{-1,1166}$
	$R^2 = 0,9999$	$R^2 = 0,9996$	$R^2 = 0,9973$	$R^2 = 0,9911$	$R^2 = 0,9988$	$R^2 = 0,9979$
5	$y = 3369,46x^{-0,9949}$	$y = 2424x^{-1,0138}$	$y = 1499,8x^{-1,0156}$	$y = 6882,8x^{-1,2282}$	$y = 3014,8x^{-1,1242}$	$y = 1013,7x^{-0,9777}$
	$R^2 = 1,0000$	$R^2 = 0,9975$	$R^2 = 0,9974$	$R^2 = 0,996$	$R^2 = 0,9904$	$R^2 = 0,9987$
6	$y = 3184x^{-1,0006}$	$y = 2360,1x^{-1,0247}$	$y = 1460,4x^{-1,0303}$	$y = 4439,1x^{-1,144}$	$y = 2796,3x^{-1,1229}$	$y = 1397,8x^{-1,0766}$
	$R^2 = 0,9998$	$R^2 = 0,9995$	$R^2 = 0,9986$	$R^2 = 0,9883$	$R^2 = 0,9998$	$R^2 = 0,9977$

Para cualquiera de los tiempos de escaneo evaluados, **5, 10 ó 20 ms** (círculos, triángulos y cuadrados en la gráfica), se observa un descenso en el número de los puntos por pico establecidos al aumentar el número de transiciones escaneadas cuando se detecta en modo simultáneo QED+SRM. Al comparar ambos modos de detección para un mismo número de transiciones, la diferencia observada en el número de puntos determinados con SRM frente a QED+SRM, es más acusada cuanto menor es el tiempo de escaneo.

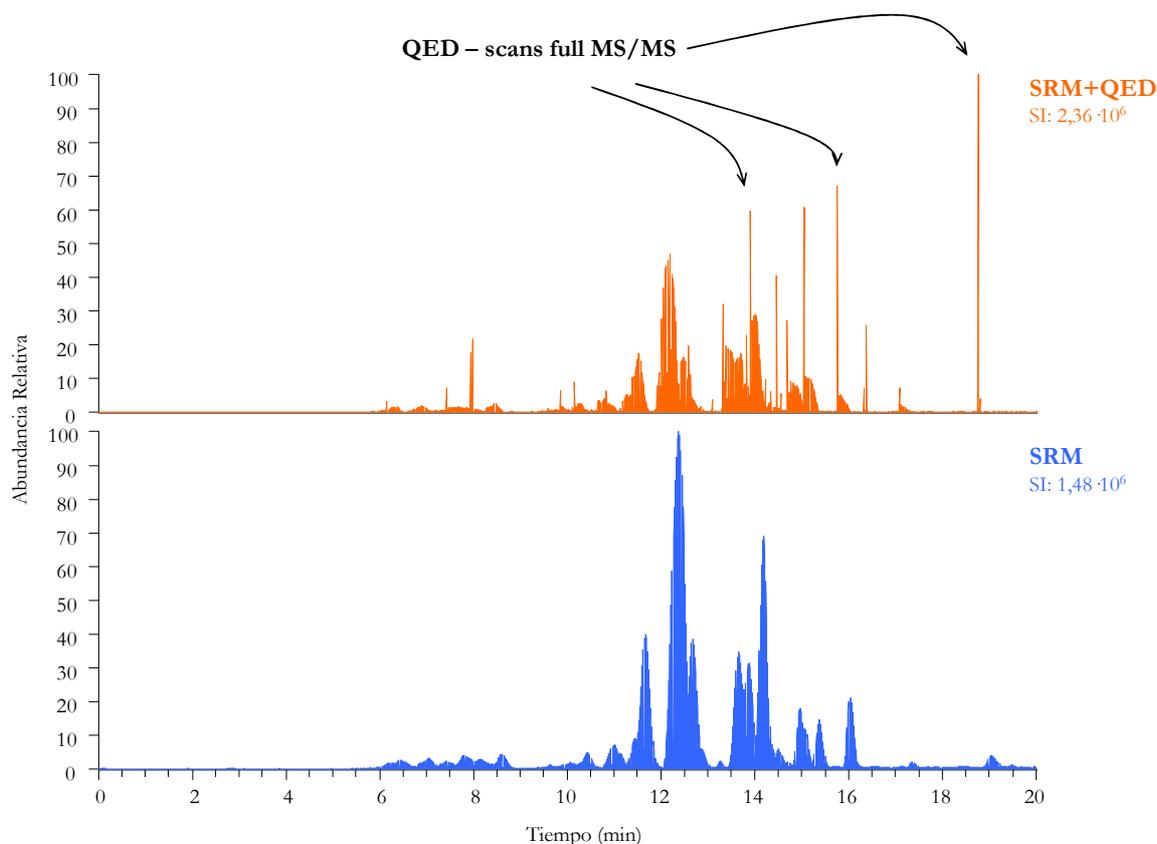


Figura IV.E.3. Cromatogramas obtenidos para dos patrones de 10 ng mL^{-1} determinando 138 transiciones con un tiempo de escaneo de 5 milisegundos en modo SRM y SRM+QED.

Otro aspecto muy interesante de este estudio de **“capacidad de detección”** del dispositivo utilizado, es la evaluación del **tiempo real de escaneo**, es decir, el tiempo que tardaría el detector en adquirir un ciclo de transiciones SRM o SRM+QED teniendo en cuenta el tiempo de escaneo y el tiempo estimado para realizar los cambios en el detector asociados a la variación de transición.

Partiendo de unos picos cromatográficos teóricos, que estarían definidos por **12 puntos** con un **ancho de pico de 30 segundos** (valor más común de ancho de pico obtenido con la columna de trabajo), y en base a las ecuaciones de las curvas obtenidas, se ha establecido

el número de transiciones máximas que el dispositivo podría realizar para cada ciclo de escaneo y, en a partir de éstas, el “tiempo real de escaneo”.

Se presentan a continuación los valores medios obtenidos a partir de los 6 compuestos estudiados.

Tabla IV.E.3. Resultados obtenidos para SRM y SRM+QED.

Modo de escaneo	Tiempo de escaneo (ms)	Nº medio de transiciones estimadas	Media de tiempo real de escaneo (ms)	Tiempo “muerto” (ms)	% de diferencia
SRM	5	266	9,4	4,4	47,0
SRM+QED	5	180	13,9	8,9	64,0
SRM	10	179	14,0	4,0	28,6
SRM+QED	10	130	19,3	9,3	48,1
SRM	20	106	23,7	3,7	15,5
SRM+QED	20	85	29,3	9,3	31,8

El tiempo “muerto” evaluado se corresponde con el tiempo de escaneo real que excede el tiempo de escaneo teórico de 5, 10 o 20 ms. Presentando estos valores en forma de porcentaje, se puede ver con más facilidad que para un mismo modo de adquisición (o bien SRM o bien SRM+QED), dado que el tiempo muerto es prácticamente el mismo en todos los casos (≈ 4 ms en caso de SRM y ≈ 9 para SRM+QED), **se comete menos “error” en el tiempo de escaneo real para tiempos de escaneo más largos.**

El tratamiento a partir de las ecuaciones exponenciales derivadas de las curvas anteriores proporciona información acerca de la **capacidad del TSQ Quantum Access para determinar un alto número de transiciones escaneando tanto en modo SRM como en modo simultáneo SRM+QED**

Se ha establecido que se pueden adquirir cerca de **270 transiciones trabajando en modo SRM**, o **180 en modo SRM+QED**, obteniendo espectros de full MS² de forma simultánea, trabajando con un tiempo de escaneo de 5 ms y con un solo segmento para la adquisición de todas las transiciones. Para la determinación de residuos de contaminantes es necesario definir cada compuesto como mínimo con dos transiciones, de forma que si se desarrolla un método multirresido a 5 ms con SRM+QED podrían incluirse cerca de 100

analitos en el estudio, si bien esta cifra podría aumentar si se utilizan dos segmentos en vez de uno.

A pesar de que el Quantum Access permite fijar un tiempo de escaneo muy bajo (1 y 2 ms) se decidió no evaluar la prestación del equipo con tiempos inferiores a 5 ms. Se sospecha que el grado de repetibilidad no sería lo suficientemente adecuado para utilizar este tiempo de escaneo con muestras reales.



V. CONCLUSIONES

V. CONCLUSIONS

Tras el desarrollo del Capítulo IV, con la presentación y discusión de los resultados obtenidos durante el período de investigación, conviene tener una visión conjunta del trabajo realizado y evaluar si se han cumplido los objetivos marcados inicialmente, y en qué medida.

Desde un punto de vista meramente analítico, se han desarrollado 3 **métodos multiresiduo** que, para dos de los casos, resultaron válidos para la determinación y evaluación de presencia de un gran número de compuestos, **alrededor de 50 pesticidas** pertenecientes a **más de 8 familias químicas**, y que presentan comportamientos muy distintos entre sí. El tercero de los métodos estuvo centrado en el estudio de unos insecticidas muy concretos, en un contexto muy específico, por lo que los analitos objetos de estudio fueron solamente 7.

Por otra parte, la utilización de diversas **técnicas de preparación de muestra** optimizadas en cada caso, además de suponer un enriquecimiento en cuanto a mi formación, representan la **versatilidad** de la química analítica a la hora de enfrentarse a diversos problemas de determinación de residuos de pesticidas a nivel de trazas.

Dos de los métodos aplicados, aquellos que requirieron un mayor desarrollo, fueron optimizados echando mano de la **quimiometría**, mediante el estudio de **superficies de respuesta** facilitadas tras la realización de un **diseño de experimentos**, que permitió evaluar los resultados de una forma más completa y veraz puesto que se tuvieron en cuenta la influencia tanto de factores principales como de las interacciones de los mismos.

En cuanto a la estimación de los **parámetros de calidad de los métodos propuestos**, hay que subrayar las excelentes características en lo relativo a **sensibilidad, robustez y efectividad** de los mismos, que, siendo desarrollados de acuerdo con las líneas establecidas a tal efecto por la legislación Europea, han supuesto una herramienta para el análisis de muestras alimentarias y medioambientales. Estos métodos se caracterizan por una sensibilidad que permite detectar e incluso cuantificar residuos de pesticidas legislados para dichas matrices a un nivel muy por debajo de los MRL, suponiendo unos límites de detección mejores que muchos de los publicados hasta la fecha.

Resaltar también que las técnicas de preparación de muestra utilizadas se han aplicado en cualquiera de los casos a “muestra bruta”; aún así, la eficacia a la hora de purificar aislar y concentrar el analito, permitió que se obtuvieran **extractos con muy poca presencia de interferencias**, de forma que los efectos matrices fueron desestimados; además la recuperación cuantitativa de **subrogados marcados isotópicamente** para evaluar la eficiencia del proceso de extracción, corroboraron la eficacia del mismo.

Parte de los trabajos recogidos se en esta Memoria se han presentado en congresos internacionales y se han publicado en revistas de alto índice de impacto como son *Analytica Chimica Acta* o *Journal of Chromatography A*.

Otros aspectos del trabajo están, o bien en fase de **envío para publicación** (caso de los resultados en agua), o bien en fase de preparación para su publicación en 2010 y 2011 (caso de los resultados en suelos agrícolas).

A continuación se destacan las principales **conclusiones** relacionadas con las investigaciones desarrolladas en los distintos puntos del Capítulo IV, para poder evaluar más en detalle el alcance de los resultados derivados de este trabajo.

1. DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE PESTICIDAS EN LECHE DE VACA.

- * En este caso se desarrolló un método multiresiduo para determinar 44 analitos en muestras de leche de vaca mediante la aplicación de una novedosa técnica de tratamiento de muestra: la extracción en fase sólida dispersiva
- * La metodología propuesta resultó sencilla, rápida y eficaz, y no fue necesario realizar pretratamiento de la muestra, excluyendo la simple homogeneización de la misma.
- * Se desarrolló un método inicial sobre leche semi-desnatada que no se ajustó correctamente a la leche cruda, pero que permitió establecer una metodología (que está por validar, pero que proporciona recuperaciones muy buenas) para desarrollar un posible estudio de leche comercial.
- * Es probable que los métodos desarrollados para leche comercial no sirvan para tratar la leche cruda, dado que la leche comercial es mucho más homogénea y por lo tanto más fácil de tratar mediante percolación con cartuchos de SPE.
- * De acuerdo con la legislación vigente (Decisión 97/747/CE), las normas estipuladas para realizar el muestreo de leche requieren que han de tomarse directamente en la explotación, en el tanque de frío, sin que haya sido objeto de ningún tratamiento. Desde nuestro conocimiento y en función de la bibliografía consultada en aquel momento, este trabajo representa uno de los pocos

realizados sobre leche cruda, y el único enfocado hacia toda esta variedad de pesticidas.

* El acetonitrilo fue mejor agente de extracción para los compuestos de la matriz de leche, mientras que con el C₁₈ se lograron mejores resultados que con el CGB como agente dispersante.

* Se ha demostrado que el método de DSPE-LC-MS/MS desarrollado es tanto preciso como exacto dentro del rango de concentraciones evaluado; por otro lado, los límites de detección y cuantificación del método estuvieron siempre por debajo de los valores de límites máximos de residuo para más de la mitad de los compuestos estudiados, logrando establecer límites de cuantificación en la zona de la baja parte por billón (ng g⁻¹), que suponen valores entre 5 y 200 veces inferiores a los MRLs.

* No se cuantificó ni detectó ningún residuo de pesticidas en las muestras de leche cruda recogidas en 35 explotaciones ganaderas gallegas, por lo que se puede deducir y afirmar que la leche de origen bovino de la zona de Galicia goza de una gran calidad en términos de “no-contaminación” por residuos de estos pesticidas.

* Se ha demostrado también que a partir del mes de almacenamiento de las muestras de leche a -20 °C en botellas ámbar, se produce la degradación de los analitos en proporciones que pueden llegar a significar más del 40 % de pérdida de compuesto en tan solo dos meses.

* Finalmente, se ha desarrollado un estudio paralelo al de la determinación de residuos, consistente en la evaluación de la distribución de los compuestos estudiados entre las fracciones lipídica y acuosa de la leche cruda de vaca. Los resultados ponen de manifiesto la potencia de la DSPE y verifican el carácter lipofílico de aquellos compuestos con un valor teórico de K_{ow} elevado, que son los que migran en mayor proporción hacia la fracción grasa.

2. DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE PESTICIDAS EN MUESTRAS DE MIEL Y POLEN.

* En este caso se desarrolló un método multiresiduo para determinar 7 analitos, 3 insecticidas con un alto índice de toxicidad para las abejas

(imidacloprid, tiametoxam y fipronil) y 4 metabolitos del fipronil, para evaluar la posible relación de estos compuestos con el síndrome de despoblamiento de las colmenas.

* Se ha desarrollado un método basado en un sencillo procedimiento de extracción líquido-líquido seguido de una SPE para purificar el extracto, partiendo de una porción de panal de composición muy heterogénea y compleja, obteniendo un extracto exento de interferencias a juzgar por el casi nulo efecto matriz que se ha observado para el conjunto de analitos.

* El pretratamiento de las muestras que permite aplicar este método a cualquier porción de panal, implica la separación de la miel y partículas de polen y otros constituyentes del panal, del resto más “grueso” que se compone mayormente por ceras y larvas, obteniendo una porción representativa de la muestra bruta.

* Los parámetros de calidad del método validado en base a la norma SANCO más reciente y a la decisión 2002/657/CE, denotan la alta calidad analítica del método desarrollado, capaz de cuantificar analitos en concentraciones más de 10 veces inferiores a los MRL de aquellos compuestos legislados en miel.

* La aplicación de esta metodología a una centena de muestras de panales de colmenas puso de manifiesto la ausencia de residuos ni tan siquiera detectables para la totalidad de las muestras evaluadas. Por lo tanto, en el ámbito de la seguridad alimentaria, se puede afirmar que la miel de Galicia cumple ampliamente con los preceptos legales en cuanto a los límites máximos de residuos de imidacloprid, tiametoxam y fipronil (and fipronil sulfone).

* Este trabajo ha formado parte de una investigación global que, evaluando la influencia de otros factores como parásitos o virus, pretendía desvelar las posibles causas de la elevada mortalidad de las abejas. Las conclusiones de nuestro estudio ponen de manifiesto que, al no existir residuos de los analitos, la muerte de las abejas en las colmenas debe de estar explicada por otros factores. Así que los insecticidas no deben de suponer un papel determinante en el Síndrome de despoblamiento de las abejas, tal y como indican las hipótesis más recientes, que se centran en la presencia de organismos patógenos, especialmente el *Nosema Ceranea*.

* El doble enfoque epidemiológico y estadístico de los resultados globales apunta a un efecto multi factorial, resultando de la interacción de los factores *Nosema Ceranea* y *Varroa*. Finalmente, cabe resaltar los últimos trabajos publicados en la materia que sugieren un efecto sinérgico entre la presencia de *Nosema* y la exposición a dosis sub-letales (< 0.1 ng/g) de imidacloprid.

3. DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE PESTICIDAS EN MUESTRAS DE AGUA DE RÍO.

* En este caso, los pesticidas objeto de estudio fueron 54 y la investigación permitió evaluar el estado de las aguas superficiales de las cuencas del río Xallas y del alto Miño, que se encuentran en dos zonas geográficas con un carga ganadera de las más elevadas de Galicia.

* Los resultados extraídos en dos años de muestreo indican que los pesticidas detectados de forma más común fueron acetocloro, alacloro, atrazina y terbutilazina, así como algunos de sus metabolitos en cualquiera de las dos cuencas estudiadas.

* En ambos casos, las concentraciones detectadas para estas cuatro sustancias muestran una variación estacional, coincidiendo los muestreos en los que se determinaron las mayores concentraciones con las épocas correspondiendo a la siembra de maíz y a la aplicación de los herbicidas en las parcelas.

* Durante la realización de este estudio (en 2008), se prohibió la aplicación de dos de las sustancias prioritarias evaluadas, atrazina y alacloro. Como resultado, se ha observado una clara disminución de las concentraciones de dichas sustancias en los ríos en 2008, lo que demuestra que los agricultores de la zona, desarrollan prácticas agrícolas respetando los requisitos legales en cuanto a aplicación de productos fitosanitarios.

* De los 54 pesticidas evaluados, 7 son sustancias prioritarias y, por lo tanto, para cada una de ellas se ha fijado Estándares de Calidad Medioambiental (ECM): una concentración máxima admisible (CMA) y una concentración media anual (MA). De estas siete, solamente se han detectado alacloro y

atrazina, y el seguimiento de las mismas ha puesto de manifiesto que en ningún caso se ha superado los umbrales de concentración que fijan los ECM para estas sustancias.

* Por último, ciertas comparaciones realizadas con estudios llevados a cabo en otras cuencas en Europa, ponen de manifiesto que los compuestos que detectamos están presentes de forma bastante habitual en ríos situados cerca de zonas de cultivo intensivo. Sin embargo, los niveles de residuos de pesticidas evaluados tanto en Miño como en Xallas están por debajo de los niveles registrados en estos estudios, lo cual denota la calidad de estas aguas superficiales.

4. DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE PESTICIDAS EN MUESTRAS DE SUELOS AGRÍCOLAS.

* En este caso, el estudio abarcó un total de 27 pesticidas en parcelas de suelos agrícolas situados en la cuenca del río Xallas, cuya monitorización de aguas superficiales fueron incluidas en el capítulo anterior.

* Los límites de detección y cuantificación del método desarrollado se situaron en la zona baja de la parte por billón, resultando inferiores a 4 ng g⁻¹ para la mayoría de los pesticidas. Estas prestaciones analíticas son muy satisfactorias y en todo caso más que suficientes para cumplir con los objetivos propuestos, es decir la determinación de perfiles de concentración en la columna de suelo y la evolución de las concentraciones a lo largo del año agronómico.

* Se evaluaron los porcentajes de recuperación de los pesticidas en función de la textura y del contenido en materia orgánica de los suelos, observando en muchos casos rendimientos de recuperación superiores a 70 %. Evaluando los pesticidas agrupados por familia química, los mejores valores se obtuvieron para los piretroides y los peores valores para los organofosforados. Para alguna familia, se pudo apreciar una cierta tendencia común en cuanto a la influencia de la materia orgánica y/o de la textura sobre los porcentajes de recuperación.

* Se intentó igualmente establecer un patrón de comportamiento sobre el efecto de matriz (aumento o supresión de señal) observado en GC-MS/MS en función del porcentaje de materia orgánica en los suelos. A tenor de los

resultados, se pudo observar una cierta tendencia en el aumento de “% de efecto matriz” al aumentar la materia orgánica.

* El rango de variación de los efectos de matriz fueron desde un 20% (las triazinas por ejemplo) a un 60%, y para alguno de los piretroides se registraron datos de aumento de señal muy superiores a estos valores.

* Para la gran mayoría de los piretroides y para algunos organofosforados se constató que los efectos de matriz eran estables con la variación del contenido de materia orgánica.

* Los pesticidas encontrados en los suelos recogidos en el periodo de pre-siembra fueron exactamente los mismos que los detectados en las aguas superficiales de la cuenca, salvo el clorpirifos que no se llegó a detectar en agua. Las concentraciones medias de los herbicidas atrazina, alacloro, acetocloro, terbutylazina y metolacloro se situaron entre 6 y 30 ng g-1 con valores máximos alcanzando los 100 ng g-1 para acetocloro y terbutylazina.

En esta Tesis se han expuesto los primeros resultados de una investigación que continuará enfocada especialmente en la determinación de los perfiles de concentración de pesticidas en muestras de suelo tomadas en días posteriores al periodo de siembra/aplicación de fitosanitarios y también, posteriormente durante el mes de octubre, tras la recogida del maíz.

Following the development of Chapter IV, with the presentation and discussion of the results achieved, it should be now provided a joint vision of the work done and assess whether it have met the goals marked initially, and to what extent.

From an analytical point of view, three multiresidue methods have been developed and in two cases, they were suitable for the determination and assessment of the presence of a large number of compounds (around 50 pesticides belonging to more than 8 chemical families) and that show different behavior among themselves. The third method focused on the study of very concrete insecticides in a very specific context, so that the target analytes were only 7.

Moreover, the use of various techniques for the sample preparation optimized in each case, in addition to ensure an enrichment with respect to my training, symbolize the versatility of the analytical chemistry at the time to deal with various problems for the determination of residues of pesticides at trace level.

Two of the methods applied, those ones requiring a greater development, were optimized thanks to chemometric tools, through the study of response surfaces provided by experimental designs, which allowed a rigorous assessment of the results since the influence of the main factors and their interactions were taken into account.

As regards the quality parameters of the proposed methods, we must emphasize the excellent characteristics such as sensitivity, robustness and effectiveness. They were developed in accordance with the guidelines laid down by the European legislation, and they provided a powerful tool for the analysis of food and environmental samples. The achieved method performance enabled the detection and quantification of pesticide residues for such matrixes to levels well below the MRLs, giving detection limits much better than those published to date.

It should be also stressed that the sample preparation techniques have always been implemented to raw samples; even so, the effectiveness of the purification, isolation and concentration steps allowed obtaining extracts with very few interferences, thereby minimizing the matrix effects. In addition, the quantitative recovery of isotopically labeled surrogates corroborated the effectiveness if the extraction process.

Part of the work collected in this Memory have been presented in international congresses and have been published in journals of high impact factor, such as *Analytica Chimica Acta* or *Journal of Chromatography A*.

Other aspects of the work are, or in submission phase for publication (case of the results in water), either in preparation for publication in 2010 and 2011 (case of the results in agricultural soils).

The following paragraphs highlight the main findings of these studies, in order to assess in greater detail the scope of the results arising from them.

1. DETERMINATION OF RESIDUES OF PESTICIDES IN COW'S MILK.

* In this case, a multiresidue method was developed to determine 44 analytes in samples of cow's milk through the implementation of a novel sample treatment technique: the dispersive solid phase extraction, DSPE.

* The methodology proposed was simple, quick and effective, and it was not necessary to conduct sample pre-treatment, apart from the simple homogenization of the same.

* The initial method tested on UHT semi-skimmed milk was not well suited to raw milk, but allowed to define a possible methodology (It still needs to be validated, but provides good recoveries) to be applied to UHT milk.

* Actually, the methods developed for commercial milk do not serve to treat raw milk, given that the commercial milk is much more homogeneous and therefore best suited to percolate through the SPE cartridges.

* According to the current legislation (Decision 97/747/EC), the rules set for the milk sampling require that it has to be taken directly from the farm, in the cold tank, without any pre-treatment. To the best of our knowledge, this work constitutes one of the few made on raw milk and the only focused on such diversity of pesticides.

* Acetonitrile was better extraction agent for compounds of the milk matrix, while C18 cartridge achieved better results than CGB as dispersive agent.

* The DSPE-LC-MS/MS developed method was shown to be precise and accurate within the range of concentrations covered; on the other hand, the detection and quantification limits were always below the values of the MRLs for more than half of the compounds studied, achieving limits of quantification

at the lower part per billion (ng g⁻¹), between 5 and 200 times lower than the MRLs.

* Not any pesticide residues could be detect in all samples of milk collected in 35 dairy farms from Galicia, so that it can be deduced that the milk of bovine origin of the Galicia area is a high-quality standard in terms of “no-contamination” by these pesticide residues.

* The study also shown that analyte degradations starts producing from the month of storage of the milk samples at -20 °C, to reach more than 40 % of compound loss after two months.

* Finally, a parallel study to that of the determination of residues was implemented, consisting of an assessment of the distribution of the target compounds between the hydrophobic and aqueous fractions of the raw cow's milk. The results underlined the power of the DSPE and verify the lipophilic character of those compounds with a theoretical high value of K_{ow}, which are those that migrated in the greater proportion towards the fat fraction.

2. DETERMINATION OF RESIDUES OF PESTICIDES IN RAW SAMPLES OF HONEY AND POLLEN.

* In this case, a multiresidue method was developed to determine 7 analytes, 3 insecticides with a high toxicity index for honeybees (imidacloprid, thiamethoxam and fipronil) and 4 metabolites of fipronil, to assess whether residues of these compounds could be linked to the so-called “Collapse Colony Disorder”.

* A method based on a simple liquid-liquid extraction procedure followed by SPE to purify the extract was developed, by using a complex and heterogenic portion of hive, obtaining an extract free of interference on the basis of the almost “zero matrix effect” observed for all analytes.

* The sample pre-treatment enabling the application of this method to any hive portion implies the separation of honey, pollen particles and other

constituents from the remaining solid residual, which is composed by waxes and larvae, obtaining a representative portion of the raw sample.

* The quality parameters of the validated method based on the most recent SANCO guidelines and on the decision 2002/657/EC reflect the high analytical quality of the method, able to quantify analytes at concentrations more than 10 times lower than the MRL of those compounds legislated in honey.

* The proposed validated method was applied to the analysis of raw honey/pollen samples collected in two sampling campaigns in colonies of 73 apiaries located in Galicia (NW Spain). Not any detectable residues of the target pesticides were found in the 91 analyzed samples. Therefore, in terms of food safety, we can say that the honey produced in Galicia fully complies with the legal maximum residue limits of imidacloprid, thiamethoxam and fipronil (and fipronil sulfone).

* This study took part in a global project which intended to find out the possible causes of the high mortality of honeybees by assessing the influence of other factors such as parasites or virus. The conclusions of our study highlighted the absence of insecticide residues, so that the death of bees must be explained by other factors. Therefore, the insecticides should not play a decisive role in the Syndrome of depopulation of bees, as stressed by the latest hypotheses, which focus on the presence of pathogenic organisms, especially *Nosema Ceranea*.

* The double epidemiological and statistical approach of the overall results points to a multi factorial effect, resulting from the interaction of the factors *Nosema Ceranea* and *Varroa*. Finally, it should be noted the most recent studies suggest a synergy between the presence of *Nosema* and the exposure to sub-lethal dose (< 0.1 ng/g) of imidacloprid.

3. DETERMINATION OF RESIDUES OF PESTICIDES IN SAMPLES OF SURFACE WATER.

* In this case, there were 54 target pesticides and the study enabled the assessment of the state of the surface waters of the Xallas and Minho river basins, which are located in two geographical areas with the highest stocking rates of Galicia.

* After two years of sampling, the results show that the most detected pesticides were acetochlor, alachlor, atrazine and terbuthylazine, as well as some of their metabolites in any of the two basins studied.

* In both cases, the concentrations detected for these four substances show a seasonal variation, matching the samplings with the highest concentrations with the period corresponding to the maize sowing and the spreading of herbicides in the plots

* During the implementation of this study (in 2008), two of the target priority substances, atrazine and alachlor, were banned. As a result, there has been a dramatic decrease of their concentrations in water this same year, showing that farmers of the area develop agricultural practices respecting the legal requirements with regard to the application of plant protection products.

* Of the 54 pesticides evaluated, 7 are priority substances and, therefore, for each of them Environmental Quality Standards (EQS) have been set: a maximum admissible concentration (MAC) and an annual average concentration (AAC). Of these 7 compounds, only alachlor and atrazine have been detected and their follow-up revealed that the concentration thresholds laid down by the EQS for these substances have never been exceeded.

* Finally, some comparisons made with studies carried out in other basins in Europe reveal that the compounds detected in the present study are usually present in rivers near intensive crop areas. However, the levels of pesticide residues evaluated both in Miño and in Xallas are below the levels registered in other studies, reflecting the quality of these surface waters.

4. DETERMINATION OF RESIDUES OF PESTICIDES IN SAMPLES OF AGRICULTURAL SOILS.

* In this case, the study covered a total of 27 pesticides on plots of agricultural land located in the Xallas basin, whose surface water monitoring was included in the previous chapter.

* The limits of detection and quantification of the method stood in the low part per billion, being less than 4 ng g⁻¹ for the majority of pesticides. These analytical performances are very satisfactory and in any case meet the proposed objectives, namely the determination of concentration profiles in the soil column and the evolution of the concentrations throughout the agronomic year.

* The recoveries of pesticides were assessed on the basis of the texture and content of organic matter in the soil, providing in many cases yields of recovery higher than 70 %. Assessing the pesticides grouped by chemical family, the best values were obtained for the pyrethroids and the worst values for the organophosphorus. In some cases, we could observe a certain common trend regarding the influence on the recoveries of the organic matter and/or the texture.

* An attempt was made to establish a behavior pattern of the matrix effect (enhancement or suppression of signal) occurring in GC-MS/MS, as a function of the percentage of organic matter in the soil. According to our results, it could be deduced that an increase of organic matter seemed to lead to an increase of "% of matrix effect".

* The matrix effects ranged from 20 % (triazines for example) to 60 %, and for some pyrethroids a signal increase much higher than these values was recorded.

* For the majority of pyrethroids and for some organophosphorus, we found that the matrix effects were stable with the variation of organic matter content.

* The pesticides found in soils collected in the pre-sowing period were exactly the same as those detected in surface waters of the basin, except chlorpyrifos that was never detected in water. The average concentrations of the herbicides atrazine, alachlor, acetochlor, terbutylazine and metolachlor ranged between 6 and 30 ng g⁻¹, with maximum values reaching 100 ng g⁻¹ for acetochlor and terbutylazine.

In this Thesis, we have exposed the first results of an investigation that will continue focusing on the determination of concentration profiles of pesticides in soil samples taken only several days after the sowing/application period of pesticides and also later on, in October after the maize collection.



VI. ANEXOS

ANEXO I - FAMILIAS QUÍMICAS

VI.A. COMPUESTOS ORGANOFOSFORADOS

1. INTRODUCCIÓN.....	- 314 -
2. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS.....	- 314 -
3. PRODUCCIÓN Y USOS.....	- 319 -
4. TOXICIDAD.....	- 320 -
4.1. ABSORCIÓN Y DISTRIBUCIÓN.....	- 321 -
4.2. MECANISMO DE ACCIÓN.....	- 321 -
4.3. ELIMINACIÓN.....	- 323 -
4.4. TOXICIDAD EN HUMANOS.....	- 324 -
4.5. TOXICIDAD EN ORGANISMOS NO-DIANA.	- 324 -
5. DISTRIBUCIÓN EN EL MEDIOAMBIENTE.....	- 325 -
5.1. APLICACIÓN A CULTIVOS.	- 325 -
5.2. TRANSPORTE, REPARTO Y ACUMULACIÓN.....	- 325 -
5.3. TRANSFORMACIÓN Y DEGRADACIÓN.....	- 326 -
6. BIBLIOGRAFÍA.	- 327 -

1. INTRODUCCIÓN.

Los pesticidas organofosforados son compuestos de síntesis conocidos desde principios del siglo XIX. Los primeros utilizados como fitosanitarios fueron ésteres del ácido fosfórico, a los que se agregó después el paratión, que a pesar de su antigüedad sigue siendo de uso común en todo el mundo.

Durante la Segunda Guerra Mundial, Schrader desarrolló un compuesto de fósforo altamente tóxico que fue llamado tabún, y que, al igual que el sarín o el somán, fue utilizado como arma química, dentro de un grupo de sustancias que se dio a conocer como “gases nerviosos” [1].

Las investigaciones realizadas acerca de las propiedades insecticidas de estos compuestos, fueron motivo de un acusado aumento en la producción de los mismos al revelarse como útiles elementos de lucha contra las plagas de insectos, por lo que forman parte como ingredientes activos de muchos formulados comerciales [1]. Supusieron una alternativa a los compuestos organoclorados dado que a pesar de tener una alta eficiencia plaguicida, son menos resistentes en el ambiente puesto que no se acumulan y se degradan de una forma relativamente fácil.

2. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS.

Los pesticidas organofosforados son sustancias sintéticas, normalmente, ésteres, amidas o tioles, derivados de los ácidos fosfórico (H_3PO_4), fosfónico (H_3PO_2), fosfínico y fosforoso (H_3PO_3) [2].

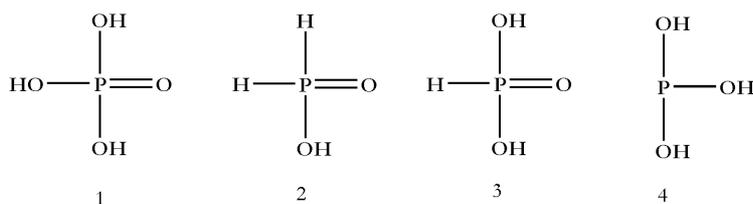


Figura VI.A.1. Estructura de los ácidos fosfórico (1), fosfónico (2) fosfínico (3) y fosforoso (4).

Dentro de la misma familia química, se engloban más de una decena de compuestos distintos, siendo los organofosforotioatos y organofosfonatos los más habituales cuando se habla de actividad insecticida. En la mayoría de los casos, la estructura se corresponde con el esquema que se muestra en la figura VI.A.2 [2, 3].

Los compuestos organofosforados son ésteres, amidas o tioderivados, en donde L, R₁ y R₂, son sustituyentes que determinarán el tipo de compuesto. Además, atendiendo al átomo que está unido al fósforo por el doble enlace (X), podemos diferenciar **oxones**, si se trata de un átomo de oxígeno y **tiones** si es un átomo de azufre [4] Por otra parte, R₁ y R₂ suelen ser grupos aloxi (O-alquilo) o ariloxi (O-arilo) y constituyen el grupo básico de la molécula, mientras que L frecuentemente se trata de grupos fenoxi, alcoxi, tioalquil o sistemas aromáticos; constituye el grupo ácido de la molécula y es el que confiere las propiedades físico-químicas que determinan su actividad plaguicida. En función de los grupos que ocupan esta posición se distinguen 4 clases de compuestos [5].

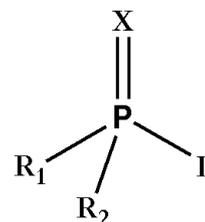


Figura VI.A.2. Estructura de los pesticidas organofosforados.

Tabla VI.A.1. Categoría de organofosforados en función del sustituyente en L (figura VI.A.2).

	Sustituyente en L	Características
Categoría I	Contiene un nitrógeno cuaternario	Son los más tóxicos. No se usan como insecticidas
Categoría II	Fluor	Son muy volátiles. Usados como gases de guerra.
Categoría III	Grupo CN, OCN, SCN u otro halogenado que no sea flúor	Utilizado como gas de guerra y no como insecticida.
Categoría IV	Otra molécula distinta de las anteriores. Se divide en 8 subgrupos en relación con los sustituyentes R ₁ y R ₂	Incluye la mayoría de los compuestos utilizados como insecticidas

A pesar de que el conjunto de pesticidas organofosforados incluye compuestos con estructuras muy distintas, generalizando, puede decirse que:

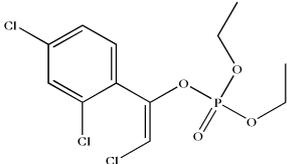
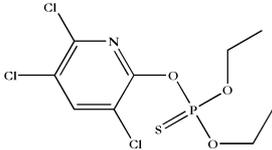
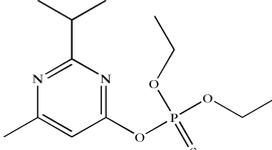
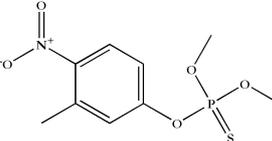
- son compuestos marcadamente **apolares**, por lo que presentan una baja solubilidad en agua [1]. La porción fosfato, tio o ditiofosfato de la molécula afecta a la polaridad por lo que presentan diferentes grados de liposolubilidad [6].

- la gran mayoría presenta una **baja presión de vapor**, lo que determina su **baja volatilidad**, pero al igual que ocurre con la polaridad, depende de la estructura, por lo que se pueden presentar como líquidos o sólidos, aunque la mayoría de ellos se presentan en forma de líquidos volátiles; dicha volatilidad se aumenta con la temperatura disminuyendo la acción residual del plaguicida al disiparse fácilmente en el ambiente.

- el grado de hidrólisis está fuertemente afectado por el pH; sufren **hidrólisis en medio alcalino** en tierra y en líquidos biológicos, no siendo persistentes en el ambiente [4]. Debido a efectos de inducción en el doble enlace con el fósforo, los oxones se hidrolizan más fácilmente que los tionos, compuestos químicamente más inestables, que por la acción de la luz solar y en presencia de oxígeno, se convierten en oxones.

Se resumen a continuación los pesticidas organofosforados estudiados en este trabajo

Tabla VI.A.2. Identificación de los pesticidas organofosforados estudiados en esta Tesis [7].

Compuesto	Formula Molecular	Nombre CAS [Número CAS]	Estructura
Clorfenvinfós	$C_{12}H_{14}Cl_3O_4P$	2-chloro-1-(2,4-dichlorophenyl)ethenyl diethyl phosphate [470-90-6]	
Clorpirifós	$C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$	O,O-diethyl O-(3,5,6-trichloro-2-pyridinyl) phosphorothioate [2921-88-2]	
Diazinón	$C_{12}H_{21}N_2O_3PS$	O,O-diethyl O-[6-methyl-2-(1-methylethyl)-4-pyrimidinyl] phosphorothioate [333-41-5]	
Fenitrotión	$C_9H_{12}NO_5PS$	O,O-dimethyl O-(3-methyl-4-nitrophenyl) phosphorothioate [C ₉ H ₁₂ NO ₅ PS]	

Compuesto	Formula Molecular	Nombre CAS [Número CAS]	Estructura
Fosalona	$C_{12}H_{15}ClNO_4P$ S_2	S-[(6-chloro-2-oxo-3(2H)-benzoxazolyl)methyl] O,O-diethyl phosphorodithioate [2310-17-0]	
Malatión	$C_{10}H_{19}O_6PS_2$	Diethyl [(dimethoxyphosphinothioyl)thio] butanedioate [121-75-5]	
Metil clorpirifós	$C_7H_7Cl_3NO_3P$ S	O,O-dimethyl O-(3,5,6-trichloro-2-pyridinyl) phosphorothioate [5598-13-0]	
Metil pirimifós	$C_{11}H_{20}N_3O_3PS$	O-[2-(diethylamino)-6-methyl-4-pyrimidinyl]-O,O-dimethyl phosphorothioate [29232-93-7]	
Mevinfós	$C_7H_{13}O_6P$	Methyl 3-[(dimethoxyphosphinyloxy]-2-butenolate [7786-34-7]	
Triazofós	$C_{12}H_{16}N_3O_3$ PS	O,O-diethyl O-(1-phenyl-1H-1,2,4-triazol-3-yl) phosphorothioate [24017-47-8]	

Los compuestos presentes en la tabla anterior pertenecen a los grupos de los fosforotioatos y de los fosfatos, todos con sustituyentes etilo o metilo en posiciones R_1 y R_2 pero con grupos muy diversos ocupando la posición L (figura VI.A.2). Sobre todo éste último determinará su reactividad y por lo tanto su acción fitosanitaria, afectada en gran medida por la acidez o basicidad que estos grupos confieren a la molécula, así como por efectos estéricos.

Algunas de las propiedades físico-químicas de estos compuestos se resumen a continuación.

Tabla VI.A.3. Algunas propiedades físico-químicas de los compuestos estudiados [7].

Compuesto	Solubilidad en agua (mg L ⁻¹ , 20°C)	log k _{ow}	PKa	presión de vapor mPa (25°C)	k _{oc} (ml g ⁻¹)	Log k _{oc}
Clorfenvinfós	145	3,80	-	0,53	680	2,83
Clorpirifós	1,05	4,70	-	1,43	8151	3,91
Diazinón	60	3,69	2,60	11,97	643	2,81
Fenitrotión	19	3,32	-	0,676	322	2,51
Fosalona	1,40	4,01	-	0,0156	2063	3,31
Malatión	148	2,75	-	3,10	217	2,34
Metil clorpirifós	2,74	4,00	-	3,00	4645	3,67
Metil pirimifós	11	3,90	4,30	0,002	1100	3,04
Mevinfós	600000	0,127	-	17,00	44	1,64
Triazofós	35	3,55	-	1,33	358	2,55

Llama la atención la diferencia existente para los valores en el caso del mevinfós, puesto que el resto sigue más o menos una tendencia que se corresponde con el comportamiento general esperado para organofosforados. Si observamos las estructuras presentes en la tabla VI.A.2, se puede ver que el mevinfós junto con el malatión son los compuestos con sustituyentes no fenílicos, y que tienen un menor impedimento estérico; además los otros pesticidas estudiados presentan grupos aromáticos que les confieren una alta estabilidad. Es por ello que la hidrólisis puede estar más favorecida para mevinfós y para malatión, resultando poco retenidos en los coloides del suelo y en sedimentos [8]. Estos dos compuestos son los que presentan un carácter más hidrofílico sobre todo el mevinfós, marcadamente polar, con un valor de pK_{ow} inferior a 1.

3. PRODUCCIÓN Y USOS.

Hoy en día los compuestos organofosforados son una clase de químicos sintéticos usados en distintas áreas y con multitud de aplicaciones. En el ámbito industrial puede citarse el uso como agente de flotación, como retardantes de llama presentes en plásticos, o aditivos para aceites, lubricantes y combustibles. Se conocen casos de compuestos organofosforados utilizados con fines terapéuticos como agentes antitumorales [2, 3]. Su uso más importante y extendido se encuentra en el campo de la agricultura como fitosanitario, aplicado en forma de herbicida o fungicida y sobre todo en forma de nematocida e insecticida [4]. Con este mismo

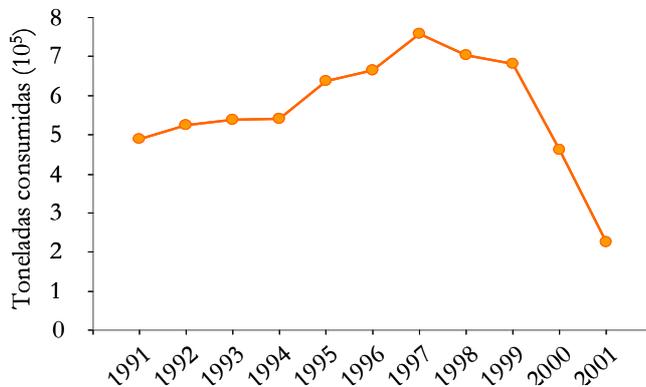


Figura VI.A.3. Evolución del consumo mundial de pesticidas organofosforados.

organofosforados alrededor de los años 50, aunque realmente entre los años 60 y 80 fue cuando se registró un importante aumento en el volumen de ventas de estos preparados. Incluso a pesar de la implantación de nuevas metodologías de control de plagas, el 40% del mercado mundial de pesticidas en 1999 estaba representado por organofosforados [3].

Como se muestra en la figura VI.A.3, La utilización de estos agroquímicos sigue la tendencia general del resto de pesticidas (como se vio anteriormente en la figura I.A.3), es decir, un **descenso en el uso de los mismos desde finales del siglo pasado**, como consecuencia de la aplicación de restricciones legales y por una tendencia clara hacia la Agricultura Ecológica. Además la alta toxicidad de este grupo de compuestos hizo que su utilización fuera paulatinamente sustituida por otros fitosanitarios menos peligrosos.

Se presentan a continuación las aplicaciones más comunes de los pesticidas organofosforados estudiados durante el desarrollo de esta Tesis (Tabla VI.A.4)

fin se utiliza también a nivel doméstico, en cuyo caso, los preparados contienen entre el 1-5% del principio activo frente al 75-95% de los productos utilizados con fines agrícolas.

Los organofosforados presentan dos características básicas: son **más tóxicos para vertebrados que los compuestos organoclorados** y **no son persistentes en el medio ambiente**, principal causa que motivó la sustitución de los pesticidas organoclorados por los

Tabla VI.A.4. Aplicaciones más comunes de los plaguicidas organofosforados presentados en esta Tesis [7, 9].

Compuesto	Tipo de plaguicida	Modo de acción	Tipo de acción	Especies diana	Campos de aplicación
Clorfenvinfós	Insecticida, acaricida	Por contacto	Vía estomacal	Moscas, pulgas y ácaros	Doméstico y ganadería
Clorpirifós	Acaricida, insecticida, nematocida	De amplio espectro. Por contacto	Vía estomacal	Pulgones, cochinillas, orugas, polillas, mosca de la fruta, y otros insectos	Cultivos agrícolas como maíz, frutales de hoja caduca, fresales, tomate, algodón. Control de almacenes agrícolas
Metil clorpirifós	Insecticida	De amplio espectro. Por contacto	Vía estomacal y respiratoria	Pulgones, cochinillas, orugas, polillas, mosca de la fruta, y otros insectos	Vid, patata, pimiento, tomate, remolacha.
Diazinón	Acaricida, insecticida	Por contacto	Vía estomacal	Moscas pulgas cucarachas	Doméstico y cosechas de frutales y hortalizas.
Malatión	Insecticida, acaricida	De amplio espectro. Por contacto	Vía estomacal y respiratoria	Mosquitos, parásitos de animales y piojos.	Cultivos de frutas y vegetales.
Metil pirimifós	Acaricida, insecticida	Por contacto	Vía estomacal y respiratoria	Ácaros, gorgojos...	Cultivos de grano (maíz, arroz...)
Mevinfós	Acaricida, insecticida	Sistémico y por contacto	Vía respiratoria	Saltamontes, gusanos, lombrices, ácaros y garrapatas	Campos, forrajes, vegetales y frutas
Fenitrotión	Acaricida, ovidica	No sistémico. Por contacto	Vía estomacal y por contacto	Insectos chupadores o masticadores y arácnidos	Doméstico y cosechas de frutales y cereales, con aplicación relativa a salud pública.
Fosalona	Acaricida, insecticida	Sistémico y por contacto	Vía estomacal y respiratoria	Araña, escarabajos, orugas	Cultivos de algodón, frutales, forrajes, colza
Triazofós	Acaricida, insecticida	Por contacto	Vía estomacal	Ácaros, insectos, larvas de moscas	Árboles frutales, algodón y cultivos alimentarios

4. TOXICIDAD.

Como se ha expuesto anteriormente, los pesticidas organofosforados son una amplia familia de compuestos que pueden diferir bastante en su estructura. El oxígeno unido al doble enlace con el fósforo es un buen nucleófilo por lo que se favorecen las reacciones de sustitución, aunque la reactividad está muy relacionada con los efectos inductivos de los sustituyentes, así como por impedimentos estéricos derivados de la estructura de la molécula. Por ello, la toxicidad de los fitosanitarios organofosforados es muy variable, aunque en general

ha resultado bastante alta, sin llegar a generar los problemas que presentan los compuestos organoclorados. Pueden acceder a los organismos por todas las vías (respiratoria, dérmica y digestiva), lo cual hace que haya un alto índice de envenenamientos sobre todo, en el caso de humanos, con aquellas personas que están en contacto directo con estos compuestos (agricultores, trabajadores de industrias...). Todos estos compuestos son susceptibles de sufrir hidrólisis, dando lugar a compuestos que se suponen como no tóxicos al nivel de concentración al que son utilizados en agricultura. Por último hay que tener en cuenta a la hora de evaluar la toxicidad, el efecto sinérgico que presentan estos compuestos cuando se aplican junto con piretroides [10].

4.1. ABSORCIÓN Y DISTRIBUCIÓN.

Debido al carácter lipofílico de estas sustancias, la piel puede suponer una importante vía de entrada al organismo; por otra parte, su alta volatilidad y la aplicación en forma de aerosoles, hace que la vía de ingreso más rápida sea la respiratoria. Además de éstos, son bastante comunes los casos de intoxicación en organismos no-objeto por vía digestiva, sobre todo con productos de uso doméstico.

Una vez absorbidos, los organofosforados y sus metabolitos se distribuyen rápidamente por todo los órganos y tejidos, aunque las concentraciones más elevadas se alcanzan en el hígado y los riñones, antes de ser eliminados en su gran mayoría por la orina y las heces. No obstante, los compuestos más lipofílicos pueden almacenarse en los tejidos grasos y el tejido nervioso, de donde pueden ser posteriormente liberados.

4.2. MECANISMO DE ACCIÓN.

La acción tóxica se ejerce siguiendo tres mecanismos [11, 12]:

- Efecto directo sobre tejidos funcionales de órganos respiratorios, hepático, digestivo...
- Inhibición de la esterasa neurotóxica (NTE), lo que produce una polineuropatía retardada.
- Inhibición de la acetilcolinesterasa (AChE) dentro del sistema nervioso.

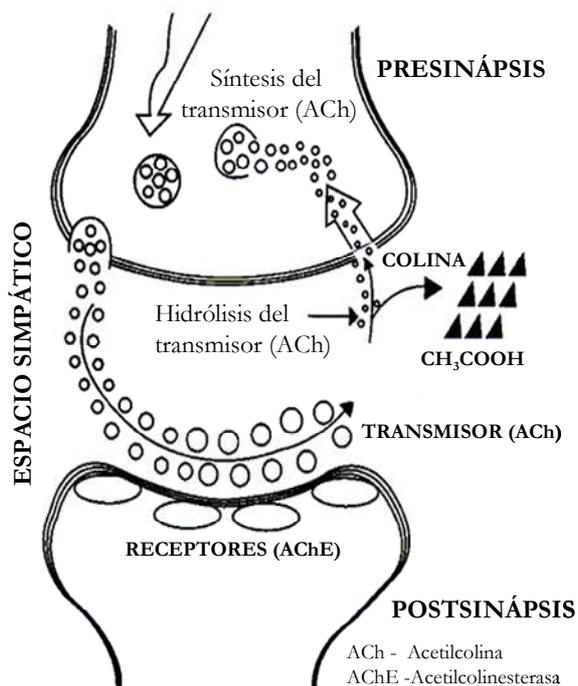


Figura VI.A.4. Esquema de la transmisión del impulso nervioso.

largo del sistema nervioso, alterando el funcionamiento normal del impulso nervioso. Esto desemboca en la parálisis del sistema nervioso y provoca la muerte de los insectos pero también la intoxicación de otros organismos no-diana.

La reacción de sustitución que causa la inhibición de la enzima se produce a través del doble enlace del fósforo. En este aspecto, la reactividad es distinta si se trata de un doble enlace P=O o doble enlace P=S. Los **oxones** son más reactivos, por lo que el poder de inhibición es alto, pero también sufren hidrólisis con mayor facilidad, por lo que el efecto insecticida es menor. Por otra parte, los tiones son más lipofílicos y atraviesan la membrana celular más rápidamente.

De los tres anteriores, el más común, es la disrupción de la enzima acetilcolinesterasa (AChE), y es el único que se produce en insectos. Para entender el mecanismo de acción de los OP es necesario entender el proceso de la sinapsis colinérgica, y en especial el momento en el que toma parte la enzima acetilcolinesterasa (AChE).

La acetilcolina es un mediador químico necesario para la transmisión de impulsos nerviosos (neurotransmisor), presente en mamíferos e insectos. Es metabolizada por la enzima acetilcolinesterasa con la consiguiente interrupción de la transmisión del impulso nervioso.

La inhibición de la reacción de sustitución que da como resultado una fosforilación de un grupo alcohol de la serina, formando un compuesto enzimático que provoca la acumulación de la acetilcolina en el espacio simpático a lo

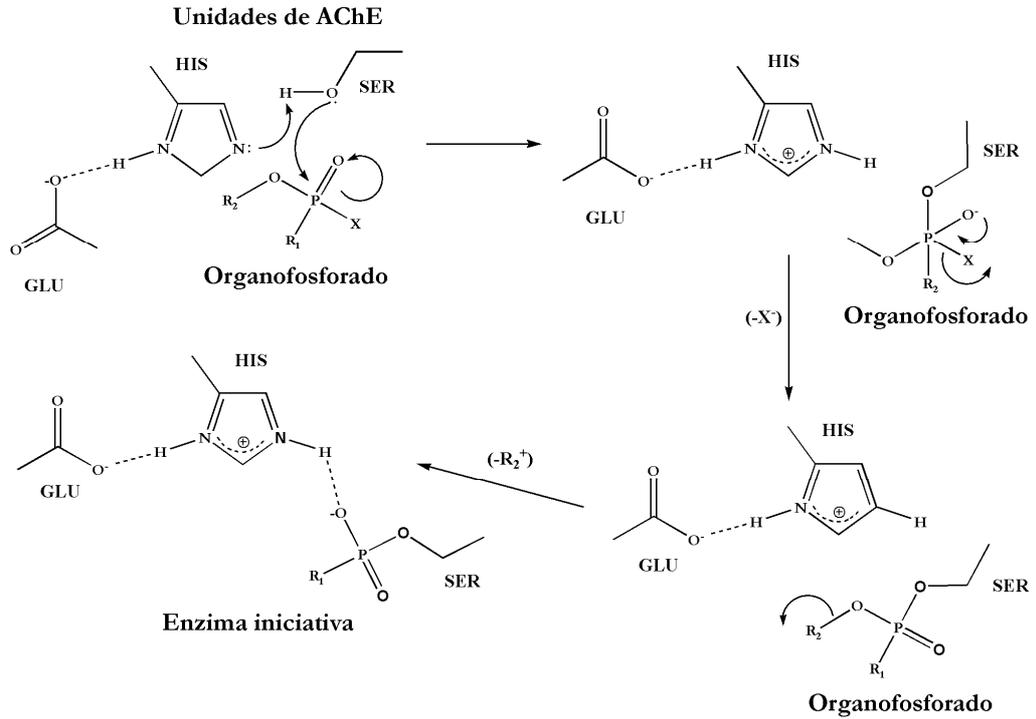


Figura VI.A.5. Mecanismo de la reacción que causa la inhibición de la ACh.

La inhibición de la AChE es sólo transitoria y únicamente la producen insecticidas, no fungicidas ni herbicidas.

4.3. ELIMINACIÓN.

La biotransformación en el organismo se realiza mayormente a nivel hepático y los productos formados son eliminados a través de la orina y las heces. Este proceso se produce mediante reacciones de oxidación, de hidrólisis y de conjugación catalizadas por las fosfotriesterasas (PTE) presentes en todos los organismos, desde bacterias a mamíferos, excepto en insectos (lo que hace posible su utilización como insecticidas) [13], siguiendo un proceso que generalmente se desarrolla en dos fases [14]:

- **Fase I:** Se introduce un grupo polar en la molécula (OH, NH₂, COOH, SH), formándose un metabolito tóxico en muchos casos.

- **Fase II:** Se producen reacciones de conjugación de los productos resultantes en la fase I para formar compuestos hidrosolubles que se excretan mayormente por la orina o bilis.

En términos generales, entre el 75 y el 100% de los organofosforados administrados por vía oral se transforman en compuestos solubles que son eliminados en un período de 1 ó 2 días tras la ingestión. Si la vía de entrada ha sido la dérmica, dado que este proceso es más lento, la eliminación total del pesticida en el organismo puede tardar algo más de tiempo [15].

4.4. TOXICIDAD EN HUMANOS.

Las intoxicaciones ocurren generalmente de forma accidental por exposición laboral, o intencional con fines suicidas. Producen tres grandes síndromes clínicos: muscarínico, nicotínico y neurológico. El tratamiento rápido con oximas junto con atropina, como antídoto de la intoxicación por organofosforados cesa la inhibición de la acetilcolinesterasa parando la acción tóxica [16] En 1987, Senanayake y Karalliedde describieron un síndrome característico de la intoxicación por organofosforados denominado “**Síndrome Intermedio**”, que consiste en parálisis progresiva de los músculos respiratorios, lengua y faringe entre otros. El colapso respiratorio representa la mayor causa de mortalidad. [17, 18]

Se estimó que en torno al 3% de los trabajadores agrícolas expuestos sufren cada año una intoxicación aguda por plaguicidas con diversos efectos sobre la salud, de gran relevancia a nivel neurológico y sensorial [19]. Más de la mitad de las mismas se producen en los países menos desarrollados [18].

Los plaguicidas organofosforados responsables del mayor número de intoxicaciones agudas son: metil-paratión, metamidofós, monocrotofós, clorpirifós, terbufós y etoprofós [18]

4.5. TOXICIDAD EN ORGANISMOS NO-DIANA.

Los distintos cuadros clínicos que se producen por intoxicación con organofosforados dependen del tipo de insecticida, de la vía de entrada, de la dosis que penetra en el organismo así como de la genética del mismo. En mamíferos causa un cuadro de neurotoxicidad retardada

que se presenta entre los 7-14 días después de la exposición al compuesto a concentraciones elevadas. Los derivados con grupo O-metil (en posición L en el esquema general, figura VI.A.2) resultan más tóxicos a estas especies [20].

Las aves son mucho más sensibles a los efectos tóxicos de los OP que los mamíferos (DL_{50} aves < DL_{50} mamíferos) debido a diferencias enzimáticas. Pueden intoxicarse a partir de la ingesta de presas envenenadas de forma accidental o intencionada [12]. Se han llevado a cabo estudios de pesticidas como paratión, fosfamidón o monocrotofos en estas especies [21]. Algunos de ellos representan una amenaza para insectos polinizadores como abejas, y también afectan a la vida a nivel acuático [22]

5. DISTRIBUCIÓN EN EL MEDIOAMBIENTE.

5.1. APLICACIÓN A CULTIVOS.

La aplicación directa a los cultivos suele hacerse en forma de emulsiones, granulados o por fumigación. Esto hace que el producto administrado se distribuya alrededor del punto de aplicación, por lo que es frecuente la presencia de estos compuestos en suelos, aguas de escorrentías y en la superficie foliar de las plantas tratadas. También es común el uso de estos compuestos en tratamiento de semillas.

5.2. TRANSPORTE, REPARTO Y ACUMULACIÓN.

Los pesticidas organofosforados **no son bioacumulables**, y **se degradan rápidamente** por reacciones de hidrólisis que dependen de factores como el pH del medio o la estructura de los compuestos. A pH neutro la vida media varía desde unas pocas horas para diclorvos a días para el paratión. En suelos ligeramente ácidos (con valores de PH entre 4 y 5) la vida media puede extenderse bastante aunque los propios constituyentes del suelo y las aguas de ríos son capaces de catalizar la degradación por sí mismos.

En medio acuático se conocen tres formas de contaminación: a partir de residuos industriales que se vierten a ríos, por escapes desde incineración de residuos tóxicos o por filtración desde suelos que han sido tratados, mediante aguas de escorrentía.

Actualmente tanto el clorpirifós como el clorfenvinfós están incluidos en la lista de las 33 sustancias prioritarias en aguas, establecidas en la legislación vigente en materia de contaminación de acuíferos.

5.3. TRANSFORMACIÓN Y DEGRADACIÓN.

En medio acuático se degradan con facilidad por efecto de la luz, partículas suspendidas o bacterias. La degradación del fenitrotión en ausencia de luz es unas 25 veces más lenta (50 días frente a 2 en presencia de luz) [23, 24].

Las formulaciones líquidas sufren reacciones de combustión, y los productos derivados de las mismas pueden llegar a ser tóxicos por inhalación o en contacto con la piel. Se degradan con el tratamiento con álcalis.

6. BIBLIOGRAFÍA.

- [1] <<http://www.siafa.com.ar/notas/nota105/plaguicidas-organofosforados.htm>> (Consulta: 22-01-2010)
- [2] Abou-Donia, M.; Organophosphorus Ester-Induced Chronic Neurotoxicity; *Arch. Environ. Health*; 58, **2003**, pp. 484-497.
- [3] Rebello, V.; Donnici, C.; Batista, J.; DaCosta N.; Rodrigues, J.; Compostos organofosforados pentavalentes: histórico, métodos sintéticos de preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais; *Quím. Nova.*; 30, **2007**, pp. 159-170.
- [4] “Plaguicidas tipo organofosforados y carbamatos”; INCAP-ECO-UNED <<http://www.cepis.ops-oms.org/bvsacd/eco/034059/034059-03.pdf>> (Consulta: 01-02-2010)
- [5] Holmstedt, B.; Pharmacology of organophosphorus cholinesterase inhibitors; *Pharmacol Rev*, 11, **1959**, pp. 567-688.
- [6] Lacorte. S.; Lartigues. S.; Garrigues. P.; Barceló. D.; Degradation of organophosphorus pesticides and their transformation products in estuarine waters. *Environ. Sci. Technol.*; 29, **1995**, pp. 431-438.
- [7] <<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/es/index.htm>> (Consulta: 16-01-2010)
- [8] Giménez, I.; “Evolución de los biocidas en el suelo” *Bol. San. Veg. Plagas*, 13, **1987**, pp. 99-116.
- [9] Pesticide Management Education Program. Cornell University <<http://pmep.cce.cornell.edu/>> (Consulta: 21-01-2010)
- [10]. Kamrin, M; *Organophosphates*. en “Pesticide Profiles: Toxicity, Environmental Impact, and Fate”; CRC Press (Boca Ratón, USA); **1997**, pp. 135-238.
- [11] Hurtado, C.; Gutiérrez, M.; Enfoque del paciente con intoxicación aguda por plaguicidas organofosforados; *Rev. fac. med. unal*, 53, **2005**, pp. 244-258.
- [12] Robles J., Hernández, T.; Luque, G.; Tratamiento de la intoxicación por organofosforados en aves rapaces; *RCCV*; 1, **2007**, pp. 424-437.

[13], Sogorb-Sanchez, M.; Vilanova-Gisbert, E.; Carrera-Gonzalez, V.; Nuevas perspectivas en los tratamientos de intoxicaciones por insecticidas organofosforados y agentes nerviosos de guerra; *Rev. Neurol.*; 39, **2004**, pp. 739-747.

[14] Hutsón, D.; Paulsón, G.; “The mammalian metabolism of agrochemicals: Volume 8: Progress in pesticide biochemistry and toxicology” John Wiley & Sons (Hoboken, USA), **1995**

[15] Ledesma, M.; Delgado P.; Predicción de la exposición a productos fitosanitarios; *Salud y trabajo*; 103, **1994**, pp. 12-19.

[16] Obiols, J.; *Plaguicidas organofosforados*. en: “Control biológico de los trabajadores expuestos a contaminantes químicos”; Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo, (Madrid), **1998**, pp. 253-288.

[17] Murat, S.; Muhammed, G.; Intensive care management of organophosphate insecticide poisoning. *Critical Care*; 5, **2001**, pp. 211- 215.

[18] Bradberry, S.; Vale J.; *Organophosphorus and Carbamate Insecticides*. En: “Critical Care Toxicology: Diagnosis and Manegement of the Critically Poisoned Patient”; Brent, J.; Wallace, K.; Burkhart, K.; Elsevier Mosby (Filadelfia, USA), **2005**, pp. 937-946.

[19] Rosenstock, B.; Keifer, M.; Daniell, W.; McConnell R, Claypoole K.; Chronic central nervous system effects of acute organophosphate pesticide intoxication; *Lancet*; 338, **1991**, pp. 223-227.

[20] Ponce, G.; Cantú, P.; Flores, A.; Badii, M.; Zapata, R.; López, B.; Fernández, I.; Modo de acción de los insecticidas; *RESPYN*; 7, **2006**, <http://www.respyn.uanl.mx/vii/4/ensayos/modo_accion.htm> (Consulta: 17-01-2010).

[21] Goldstein, M.; Lacher, T.; Woodbridge, B.; Bechard, J.; Canavelli, S.; Zaccagnini, M.; Cobbs, G.; Scollón, E.; Triviolet, R.; Hopper, J.; Monitoring and assessment of Swainson’s Hawks in Argentina following restrictions on monocrotophos use; *Ecotoxicology*; 8, **1999**, pp. 215-224.

[22] Badii, M; Varela, S; Insecticidas organofosforados: efectos sobre la salud y el ambiente; *CulCiT*; 28, **2008**, pp. 5-17

[23] Greenhalgh, R.; Dhawan, L.; Weinberger, P.; Hydrolysis of fenitrotión in model and natural aquatic systems; *J. Agric. food Chem.*; 28 , **1980**, pp. 102-105.

[24] Drevenkar, V.; Fink, K.; Stipcević, M.; Tkalcević B.; The fate of pesticides in aquatic environment II. Hydrolysis of dichlorvos in model system and in river water; *Arh. Hig. Rada Toksikol.*; 27, 1976, pp. 297-305.

VI.B. TRIAZINAS

1. INTRODUCCIÓN.....	- 332 -
2. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS.....	- 332 -
3. PRODUCCIÓN Y USOS	- 336 -
4. TOXICIDAD.....	- 337 -
4.1. ABSORCIÓN Y DISTRIBUCIÓN.....	- 338 -
4.2. MECANISMO DE ACCIÓN.....	- 338 -
4.3. ELIMINACIÓN.....	- 339 -
4.4. TOXICIDAD EN HUMANOS.....	- 339 -
4.5. TOXICIDAD EN ORGANISMOS NO-DIANA	- 339 -
5. DISTRIBUCIÓN EN EL MEDIOAMBIENTE.....	- 340 -
5.1. APLICACIÓN A CULTIVOS	- 340 -
5.2. TRANSPORTE, REPARTO Y ACUMULACIÓN.....	- 340 -
5.3. TRANSFORMACIÓN Y DEGRADACIÓN.....	- 341 -
6. BIBLIOGRAFÍA	- 342 -

1. INTRODUCCIÓN

Este grupo de herbicidas es uno de los más conocidos y utilizados desde hace más de 40 años. Su actividad fitosanitaria fue descubierta en 1952 por J.R. Geigy en Suiza y desde entonces se han sintetizado multitud de compuestos con distintos sustituyentes que presentan diferentes grados de acción plaguicida [1].

2. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

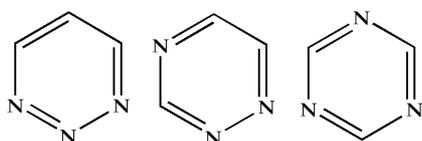


Figura VI.B.1. Isómeros de la triazina

La estructura común de estas sustancias es un anillo aromático de seis miembros en el cual están presentes 3 nitrógenos. Esta distribución permite la existencia de tres isómeros conformacionales, de manera que, dependiendo de la estructura básica, se distinguen triazinas de estructura simétrica o asimétrica. Éstas últimas presentan al menos dos nitrógenos en posiciones contiguas mientras que las simétricas, más utilizadas como fitosanitarios, responden a la fórmula 1,3,5-triazina, en su estructura básica, es decir, un anillo de seis miembros que contiene tres nitrógenos en posiciones alternadas con carbonos.

En la figura VI.B.2. se muestra la estructura general de las triazinas simétricas. El sustituyente X generalmente es un átomo de cloro, un grupo S-CH₃ o O-CH₃, y es lo que confiere la actividad pesticida al compuesto. La sustitución con otros halógenos distintos u otros grupos halogenados resulta en una actividad biológica inadecuada, si bien puede afectar a la velocidad de degradación en el medio. En las posiciones 2 y 4 normalmente están presentes sustituyentes pertenecientes a la familia de las aminas (por lo general etilamina, isopropilamina y terbutilamina). Esto da lugar a multitud de compuestos con distintas propiedades físico-químicas y fitosanitarias.

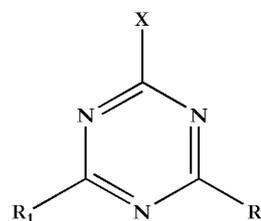


Figura VI.B.2. Estructura básica de las 1,3,5-triazinas

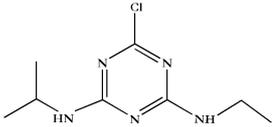
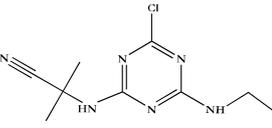
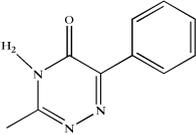
Tabla VI.B.1. Tipo de 1,3,5-triazinas en función de la estructura y los sustituyentes.

	Tipo de triazina	Sustituyente en X	Características	Ejemplos
Simétricas	Clorotriazinas	Cl	Menor solubilidad	Simazina, propazina, atrazina, cianazina
	Metilmercaptotriazina	S-CH ₃	Solubilidad intermedia	Simetróna atratona prometrona
	Metoxitriazinas	O-CH ₃	Mayor reactividad y mayor poder residual	Prometrina, simetrina, terbutrina
No simétricas			Poseen menor residualidad que las triazinas simétricas	Metribuzina

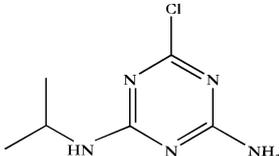
La mayoría de las triazinas comerciales tienen baja solubilidad en agua, aunque ésta varía notablemente en función de la estructura de las moléculas. La combinación de baja solubilidad y alto grado de absorción sobre coloides del suelo hace que no penetren a una profundidad mayor de 15 cm de la superficie. De ahí su actividad selectiva puesto que los árboles y las plantas con raíces más profundas no se ven afectados [1].

En este trabajo se han estudiado 8 compuestos pertenecientes a la familia de las triazinas y tres metabolitos de las mismas. Todos ellos a excepción de la metamitrona son 1,3,5-triazinas simétricas.

Tabla VI.B.2. Identificación de las triazinas estudiadas en esta Tesis [2].

Compuesto	Formula Molecular	Nombre CAS [Número CAS]	Estructura
Atrazina	C ₈ H ₁₄ ClN ₅	6-chloro-N-ethyl-N'-(1-methylethyl)-1,3,5-triazina-2,4-diamine [1912-24-9]	
Cianazina	C ₉ H ₁₃ ClN ₆	2-[4-chloro-6-(ethylamino)-1,3,5-triazin-2-yl]amino]-2-methylpropanenitrile [21725-46-2]	
Metamitrona	C ₁₀ H ₁₀ N ₄ O	4-amino-3-methyl-6-phenyl-1,2,4-triazin-5(4H)-one [41394-05-2]	

Compuesto	Formula Molecular	Nombre CAS [Número CAS]	Estructura
Prometrina	C ₁₀ H ₁₉ N ₅ S	N,N'-bis(1-methylethyl)-6-(methylthio)-1,3,5-triazina-2,4-diamine [7287-19-6]	
Propazina	C ₉ H ₁₆ ClN ₅	6-chloro-N,N'-bis(1-methylethyl)-1,3,5-triazina-2,4-diamine [139-40-2]	
Simazina	C ₇ H ₁₂ ClN ₅	6-chloro-N,N'-diethyl-1,3,5-triazina-2,4-diamine. [122-34-9]	
Terbutrina	C ₁₀ H ₁₉ N ₅ S	N-(1,1-dimethylethyl)-N'-ethyl-6-(methylthio)-1,3,5-triazina-2,4-diamine [886-50-0]	
Terbutilazina	C ₉ H ₁₆ ClN ₅	6-chloro-N-(1,1-dimethylethyl)-N'-ethyl-1,3,5-triazina-2,4-diamine [5915-41-3]	
Metabolitos			
Desilterbutilazina (DETBA)	C ₇ H ₁₂ ClN ₅	6-chloro-N-(1,1-dimethylethyl)-1,3,5-triazina-2,4-diamine [30125-63-4]	
Deisopropilatrazina (DIA)	C ₅ H ₈ ClN ₅	6-chloro-N-ethyl-1,3,5-triazina-2,4-diamine [1007-28-9]	

Compuesto	Formula Molecular	Nombre CAS [Número CAS]	Estructura
Desetilatrizina (DEA)	C ₆ H ₁₀ ClN ₅	4-amino-2-chloro-6-ethylamino-s-triazine [6190-65-4]	

A la vista de las estructuras, cabe esperar que los compuestos tengan un comportamiento similar entre ellos, a excepción de la metamitrona, por ser una 1,2,4-triazina. Alguna de las propiedades físico-químicas de estos compuestos se recoge a continuación.

Tabla VI.B.3. Algunas propiedades físico-químicas de los compuestos estudiados [2]

Compuesto	Solubilidad en agua (mg L ⁻¹ , 20°C)	log <i>k</i> _{ow}	PKa	presión de vapor mPa (25°C)	<i>k</i> _{oc} (ml g ⁻¹)	log <i>k</i> _{oc}
Atrazina	35	2,70	1,70	0,039	100	2,00
Cianazina	171	2,10	12,90	0,000213	190	2,28
Metamitrona	1770	0,85	-	0,000744	80,7	1,91
Prometrina	33	3,34	9,95	0,13	400	2,60
Propazina	8,6	3,95	1,70	0,004	154	2,19
Simazina	5	2,30	1,62	0,00081	130	2,11
Terbutrina	22	3,65	4,30	0,225	2000	3,30
Terbutilazina	6,6	3,40	2,00	0,15	219	2,34
Desetilterbutilazina	327,1	2,30	-	0,35	72	1,86
Deisopropilatrazina	670	1,15	-	-	142	2,15
Desetilatrizina	3200	1,51	-	12,44	72	1,86

La mayoría de las triazinas presentan una **baja solubilidad en agua** (no así sus metabolitos), lo que indica una alta estabilidad y una mayor solubilidad en medios orgánicos. Los valores del coeficiente de adsorción (*K*_{ow}) no son muy altos, lo que sugiere un **cierto carácter lipofílico**, aunque no muy marcado por lo que se espera que no se bioacumulen en

gran medida en tejidos grasos. Por otra parte, atendiendo al valor de del coeficiente de absorción (K_{oc}), puede decirse que **tienen tendencia a retenerse en suelos**.

Los sustituyentes en X (figura VI.B.2) aumentan la basicidad en orden cloro > metilitio > metoxi > grupos alquilo. De ahí que la prometrina presente un carácter básico tan fuerte en comparación con la propazina, o la terbutrina frente a la terbutilazina. Esto afecta a la reactividad de las moléculas y a la estabilidad en medios naturales.

Por último, las **bajas presiones de vapor** indican que no estarán presentes en modo gaseoso en gran medida, por lo que la contaminación atmosférica no es de gran relevancia.

3. PRODUCCIÓN Y USOS

Aunque también se utilizan para el control de plagas vegetales, en el ámbito forestal su uso más habitual se encuentra ligado al campo de la agricultura en donde se aplican como herbicidas para controlar malezas tanto de un modo preventivo como curativo. La gran mayoría actúan sobre la acción fotosintética de las plantas. Las triazinas con sustituyentes 2,4-diaminotriazinas, 6-cloro, 6-metoxi o 6-metilitio son las que más se utilizan en este campo [1]. Se resumen a continuación los usos más frecuentes de las triazinas estudiadas en este trabajo, así como el modo de actuación de las mismas.

Tabla VI.B.4. Principales usos de las triazinas estudiadas [2, 3, 4].

Compuesto	Tipo de herbicida	Modo de acción	Aplicación sobre cultivos	Especies diana	Tipo de tratamientos	Cultivos tratados
Atrazina	Selectivo	Sistémica	Actividad foliar y de raíz	Hierbas y plantas anuales o de estación. La mayoría pertenecen a la familia de las gramíneas	Preemergencia y postemergencia temprana	Maíz, sorgo, caña de azúcar, lino y piña
Cianazina	Selectivo	Sistémica y por contacto	Absorbido por las raíces	Malezas gramíneas	Preemergencia y postemergencia	En maíz, colza, trigo
Metamitrona	Selectivo	Sistémica	Absorbido por raíces.	Quinoa, manzanilla y la poa anual.	Preemergencia y postemergencia	Maíz, frutales y remolacha
Prometrina	Selectivo	Por contacto	Absorbido por raíces y hojas	Malezas gramíneas y de hoja ancha en algodón	Preemergencia y postemergencia	Patata, apio, ajo, zanahoria, cebolla, girasol
Propazina	Selectivo	Sistémica	Absorbido	Control de malezas sobre	Preemergencia	Sorgo, maíz,

			por las raíces	todo gramíneas y crucíferas		batata
Simazina	Selectivo	Sistémica	Absorbido por raíces	Gramíneas	Preemergencia	Maíz, alfalfa, caña de azúcar y peral o vid
Terbutrina	Selectivo	Sistémica	Absorbido por raíces y hojas	Gramíneas	Preemergencia y postemergencia temprana	Trigo y maíz. Especies leñosas como olivo
Terbutilazina	De amplio espectro	Residual	Absorción radicular	Afecta a las malezas de hoja ancha	Preemergencia y postemergencia	Maíz, olivo vid, frutales, áreas no cultivadas

Tabla VI.B.5. Metabolitos de ciertas triazinas estudiados en este trabajo.

Compuesto	Compuesto padre	Persistencia en el medio
Desetilterbutilazina	Terbutilazina	Persistente en suelos, cultivos, agua, sedimentos y aguas subterráneas.
Deisopropilatrazina	Atrazina	Persistente en suelos
Desetilatrazina	Atrazina	Persistente en suelos

Dentro de este grupo de sustancias quizás la más conocida por su eficacia y la posterior problemática de contaminación del medio que acarrió su utilización sea la atrazina. Se trata del inhibidor del Fotosistema II más extensamente utilizado, con alrededor de 7 millones de hectáreas de maíz tratadas a nivel mundial anualmente.

Recientemente se han desarrollado triazinas no simétricas de mayor solubilidad y que generan menos residuos, como por ejemplo la metribuzina [5].

4. TOXICIDAD

Los síntomas típicos de toxicidad producidos por las triazinas en plantas de hoja ancha se manifiestan como un cambio de coloración (despigmentación) que se torna en necrosis si el daño es severo. La mayoría de las triazinas son levemente tóxicas para humanos y otros

mamíferos, ya sea por la vía oral, dérmica o inhalatoria. Una vez en el organismo, presentan una buena absorción intestinal. Sin embargo, representan un gran riesgo para la contaminación de acuíferos y especies animales y vegetales de este medio.

4.1. ABSORCIÓN Y DISTRIBUCIÓN.

Como se ha expuesto en la tabla VI.B.4., son principalmente absorbidas por la raíz de la planta, si bien las que tienen alta solubilidad en agua pueden penetrar en la planta por las hojas. Las de acción sistémica son transportadas por el xilema al resto de la planta, mientras que cuando son aplicados al follaje son absorbidas por la planta actuando como herbicidas de contacto.

4.2. MECANISMO DE ACCIÓN

La gran mayoría de herbicidas inhiben la fotosíntesis siguiendo dos mecanismos distintos [6]:

- Por sustracción de Electrones del Fotosistema I: compiten con el NADP⁺ como aceptores de electrones en el proceso de fotosíntesis. Causa daños celulares extensos como consecuencia de una serie de reacciones redox que concluyen con la formación de un anión superóxido que inicia una cascada de reacciones de radicales libres.

- Inhibidores de fotosistema II: afectan al cloroplasto incapacitando la fijación de CO₂, necesario para la producción de carbohidratos vitales para la planta. Se enlaza a la proteína D1, inhibiendo la reducción de la plastoquinona (PQ) provocando la interrupción del proceso de transferencia fotosintética de electrones. Los síntomas aparecen primero en las hojas jóvenes, que sufren clorosis hasta que finalmente se secan. [3]

Todas las triazinas estudiadas en esta Tesis actúan por inhibición del fotosistema II.

4.3. ELIMINACIÓN

En los organismos son extensamente metabolizadas a nivel hepático por proteínas y enzimas, a través de reacciones de oxidación, pero también de reducción e hidrólisis, produciendo una gran variedad de metabolitos excretados por vía renal. Estos metabolitos son: 80% dealquil, 10% deisopropil, 8% dietil y 2% sin alteraciones. Cuando el contacto es cutáneo, el metabolismo se lleva a cabo a nivel dérmico generando muchos subproductos, de los cuales el 50% son deisopropil. [7]

4.4. TOXICIDAD EN HUMANOS

En general, la exposición de corta duración en los seres humanos provoca el enrojecimiento de los ojos y puede causar efectos negativos a nivel del sistema nervioso central. Si la exposición es prolongada o repetida pueden producir dermatitis o sensibilización de la piel, o incluso afectar al hígado y al riñón, pero no se bioacumulan ni se biomagnifican [8].

De las estudiadas en este trabajo, la atrazina y la simazina son quizás las más peligrosas para los humanos. Están incluidas en el censo Europeo de Disruptores Endocrinos, la primera con acción disruptora comprobada y la segunda con acción disruptora sospechada [9-11]. Además alteran la síntesis de ciertos neurotransmisores y la simazina puede originar lesión genética en humanos y retrasos en el desarrollo de recién nacidos [12].

4.5. TOXICIDAD EN ORGANISMOS NO-DIANA

En general la toxicidad en otros organismos no es muy elevada: son compuestos de baja toxicidad para los mamíferos (a excepción de la cianazina) y moderadamente tóxicos para los pájaros e insectos; sin embargo pueden afectar de forma muy negativa a los organismos acuáticos, tanto peces como plantas tipo algas o juncos. A pesar de su acumulación en los acuíferos, no resultan tóxicos para invertebrados de agua dulce [13].

La propazina y simazina resultan altamente tóxicas para especies acuáticas, y están asociadas con tumores mamarios en algunos animales producidos por mecanismos hormonales, a igual que la atrazina que además produce daño renal y hepático. Ésta está clasificada como compuesto peligroso para el medio ambiente y muy tóxico para los organismos acuáticos; no obstante para las aves el nivel de toxicidad es bastante bajo.

La simazina y atrazina están incluidas en la lista de 33 sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas establecida en la Directiva 2000/60/CE.

5. DISTRIBUCIÓN EN EL MEDIOAMBIENTE

La acumulación en el medioambiente es la mayor problemática que presenta este tipo de fitosanitarios. Una vez incorporadas en el suelo pueden ser absorbidas por las plantas o degradadas durante un periodo de días a meses aunque en general se puede afirmar que son altamente persistentes (algunos hasta un año), lo que puede provocar contaminación de las aguas subterráneas cercanas [8], en donde permanecerán periodos de tiempo generalmente mayores puesto que su degradación en este medio suele ser más lenta.

La cantidad de residuo de estos compuestos presente en el medio está estrechamente relacionada con la temperatura, humedad y contenido de materia orgánica del suelo, así como con la dosis empleada.

5.1. APLICACIÓN A CULTIVOS

Se suelen aplicar en forma de aerosoles, por fumigación o en forma de granulados. Son herbicidas de acción sistémica en su mayoría por lo que una vez absorbidos por la planta se translocan hasta el punto de acción.

5.2. TRANSPORTE, REPARTO Y ACUMULACIÓN.

Debido a la forma de aplicación, la entrada en el suelo de este tipo de compuestos es obligada. A juzgar por su valor de K_{oc} son persistentes en este medio pudiendo afectar a otros cultivos en prácticas agrícolas de rotación. A valores de pH bajos (< 5.0) las triazinas se cargan positivamente y quedan fuertemente unidas a los coloides del suelo, pero en medio neutro o alcalino quedan más disponibles. Bajo estas condiciones se comportan como moléculas descargadas y la fuerza de enlace dependerá de propiedades como la solubilidad en agua y la presión de vapor [3]. Su movilidad es variable, en función de la cantidad de arcilla, materia orgánica o coloides presentes en el suelo: mientras que unos tienen una alta permanencia, otros se lixivian fácilmente y pasan a los acuíferos acumulándose hasta alcanzar concentraciones

dañinas para organismos acuáticos. Además afectan a las aguas potables si se aplican en parcelas cercanas a embalses dedicados a tales efectos.

5.3. TRANSFORMACIÓN Y DEGRADACIÓN

Se degradan fácilmente por hidrólisis a pH ácidos o muy básicos, pero no intermedios. La hidrólisis en suelos de 1,3,5-triazinas se da mayoritariamente en aquellas que presentan un grupo hidroxilo en su estructura (metoxitriazinas). Sufren eliminación por acción de microorganismos del suelo, pero este proceso ocurre en general muy lentamente debido a la estabilidad de estas moléculas. Otro proceso importante en suelos es la desalquilación de las cadenas laterales, que ocurre también en plantas y animales a pesar de que en estos organismos son más frecuentes las reacciones de conjugación resultando en una compleja serie de productos [14].

6. BIBLIOGRAFÍA

[1] Roberts T.; Herd D.; “Metabolic Pathways Of Agrochemicals, Part 1: Herbicides And Plant Growth Regulators”; Royal Society of Chemistry (Gran Bretaña), **1998**, pp. 623-654

[2] <<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/es/index.htm>> (Consulta: 02-02-2010)

[3] Labrada, R.; Casely, C.; Parker, C.; “Manejo de malezas para países en desarrollo”; Estudio FAO producción y protección Vegetal – 120. Organización de Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma, **1996**

[4] Garzón, J.; García, V.; García, J.; Villarías, J.; Efectos de la aplicación de herbicidas de acción residual sobre la germinación de las plantas de cardo (*cynara cardundullus*); *La revista profesional de sanidad vegetal*, 158, **2004**, pp. 45-52.

[5] Piedrahíta, F.; Cilia L.; D Doll, J.; *Herbicidas que afectan a la fotosíntesis*; en “Los herbicidas: modo de actuar y síntomas de toxicidad”, CIAT-Centro Internacional de Agricultura Tropical (Cali, Colombia); 2, **1982**, pp. 11-21.

[6] Hall, C.; Triazine-resistant crops: The agronomic impact and physiological consequences of chloroplast mutation en “Herbicide-resistant crops: agricultural, environmental, economic regulatory, and technical aspects”; Duke, S.; Lewis Publishers, (Boca Raton, USA), **1996**, pp. 108-114

[7] Anderson, J.; Seinen, W.; Giesy, J.; Van den Berg, M.; 2-chloro-s-triazine herbicides induce aromatase (CYP19) activity in H295R human adrenocortical carcinoma cells: A novel mechanism for estrogenicity?; *Toxicol. Sci.*, 54, **2000**, pp. 121-127.

[8] Registro estatal de emisiones y fuentes contaminantes <<http://www.prtr-es.es/>> (Consultado el 23-01-09)

[9] Argemi1, F.; Cianni, N.; Porta, A.; Disrupción endocrina: perspectivas ambientales y salud pública; *Acta Bioquím. Clín. Latinoam.*; 39, **2005**, pp. 291-300

[10] Cooper, R., Stoker, T.; Tyrey, L.; Goldman, J.; McElroy, W.; Atrazine Disrupts the Hypothalamic Control of Pituitary-Ovarian Function; *Toxicol. Sci.*, 53, **2002**, pp. 297-307

[11] Fan, W.; Yanase, T.; Morinaga, H.; Gondo, S.; Okabe, T.; Nomura, M.; Komatsu, T.; Morohashi, K.; Hayes, T.; Takayanagi, R.; Nawata, H.; Atrazine-induced aromatase

expression is SF-1 dependent: implications for endocrine disruption in wildlife and reproductive cancers in humans; *Environ. Health Perspect.*; 115, **2007**, pp. 720–727.

[12] “Triazine Cumulative Risk Assessment and Atrazine, Simazine, and Propazine Decisions”; U.S. Environmental Protection Agency (2006)

[13] LeBaron, H.; McFarland, J.; Burnside, O.; “The Triazine herbicides: 50 years revolutionizing agriculture”; Ed Elsevier (San Diego, USA), **2008**.

[14] Wackett L., Sadowsky M.; Martinez B.; Biodegradation of atrazine and related s-triazina compounds: from enzymes to field Studies; *Appl. Microbiol. Biotechnol.*; 58, **2002**, pp. 39-45.

VI.C. UREAS SUSTITUIDAS Y URACILOS

1. INTRODUCCIÓN.....	- 346 -
2. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS.....	- 346 -
3. PRODUCCIÓN Y USOS	- 350 -
4. TOXICIDAD.....	- 351 -
4.1. ABSORCIÓN Y DISTRIBUCIÓN.....	- 351 -
4.2. MECANISMO DE ACCIÓN.....	- 352 -
4.3. ELIMINACIÓN.....	- 352 -
4.4. TOXICIDAD EN HUMANOS.....	- 352 -
4.5. TOXICIDAD EN ORGANISMOS NO-DIANA	- 352 -
5. DISTRIBUCIÓN EN EL MEDIOAMBIENTE.....	- 353 -
5.1. APLICACIÓN A CULTIVOS	- 353 -
5.2. TRANSPORTE, REPARTO Y ACUMULACIÓN.....	- 353 -
5.3. TRANSFORMACIÓN Y DEGRADACIÓN.....	- 353 -
6. BIBLIOGRAFÍA	- 354 -

1. INTRODUCCIÓN

Los compuestos pertenecientes a esta familia se obtienen al sustituir tres de sus hidrógenos de la urea (Figura VI.C.1) por diversos radicales. Normalmente se aplican al suelo en donde son fuertemente retenidas, para ser absorbidas posteriormente por las raíces. Su toxicidad es menor que la de organoclorados y organofosforados y son generalmente muy persistentes en el medio. En muchas ocasiones su comportamiento es similar al descrito para las triazinas (apartado VI.B).

2. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

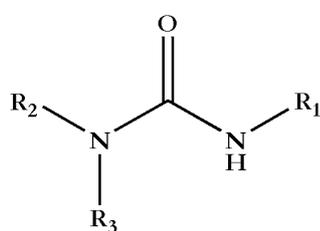


Figura VI.C.1. Estructura básica de las ureas sustituidas

El grupo de las ureas sustituidas comprende multitud de compuestos que presentan actividad fitosanitaria. Son todos derivados de la urea, cuya estructura básica se muestra en la figura VI.C.1. En función de los sustituyentes R_1 , R_2 y R_3 la reactividad de la molécula será distinta y por lo tanto también el modo de acción contra la plaga. Se usan como herbicidas (fenilureas y sulfonilureas) e insecticidas (benzoilureas).

La mayoría de las ureas estudiadas en capítulos posteriores de esta Tesis pertenecen a las fenilureas (con un fenilo o derivado en posición R_3). Los compuestos incluidos en este grupo, generalmente presentan radicales alquilo o metoxi en las posiciones R_2 y R_3 , formando N-fenil-N,N-dialquilureas, N-fenil-N-metoxiureas.

Un caso particular dentro de las ureas sustituidas es el de los uracilos (figura VI.C.2.), que presenta unas propiedades diferentes a las ureas no heterocíclicas. El uracilo es una pirimidina, una de las cuatro bases nitrogenadas que forman parte del ARN. Los pesticidas derivados de este compuesto constituyen herbicidas más activos que las triazinas y ureas pero su acción es similar a la de estas familias de compuestos.

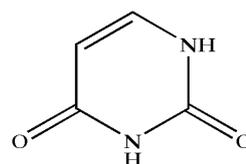


Figura VI.C.2. Uracilo

Tabla VI.C.1. Identificación de las ureas estudiadas en esta Tesis [1].

Compuesto	Formula Molecular	Nombre CAS [Número CAS]	Estructura
Bromacil	$C_9H_{13}BrN_2O_2$	5-bromo-6-methyl-3-(1-methylpropyl)-2,4(1H,3H)-pyrimidinedione [314-40-9]	
Cloroxurón	$C_{15}H_{15}ClN_2O_2$	N'-[4-(4-chlorophenoxy)phenyl]-N,N-dimethylurea [15545-48-9]	
Clortolurón	$C_{10}H_{13}ClN_2O$	N'-(3-chloro-4-methylphenyl)-N,N-dimethylurea [15545-48-9]	
Dimefurón	$C_{15}H_{19}ClN_4O_3$	N'-[3-chloro-4-[5-(1,1-dimethylethyl)-2-oxo-1,3,4-oxadiazol-3(2H)-yl]phenyl]-N,N-dimethylurea [34205-21-5]	
Diurón	$C_9H_{10}Cl_2N_2O$	N'-(3,4-dichlorophenyl)-N,N-dimethylurea [330-54-1]	
Etidimurón	$C_7H_{12}N_4O_3S_2$	N-[5-(ethylsulfonyl)-1,3,4-thiadiazol-2-yl]-N,N'-dimethylurea [30043-49-3]	
Isoproturón	$C_{12}H_{18}N_2O$	N,N-dimethyl-N'-[4-(1-methylethyl)phenyl]urea [34123-59-6]	
Linurón	$C_9H_{10}Cl_2N_2O_2$	N'-(3,4-dichlorophenyl)-N-methoxy-N-methylurea [330-55-2]	

Compuesto	Formula Molecular	Nombre CAS [Número CAS]	Estructura
Lufenurón	C ₁₇ H ₈ Cl ₂ F ₈ N ₂ O ₃	N'-[[[2,5-dichloro-4-(1,1,2,3,3,3-hexafluoropropoxy)phenyl]amino]carbonyl]-2,6-difluorobenzamide [103055-07-8]	
Metabromurón	C ₉ H ₁₁ BrN ₂ O ₂	N'-(4-bromophenyl)-N-methoxy-N-methylurea [3060-89-7]	
Metabenzthiazurón	C ₁₀ H ₁₁ N ₃ OS	N-2-benzothiazolyl-N,N'-dimethylurea [18691-97-9]	
Metoxurón	C ₁₀ H ₁₃ ClN ₂ O ₂	N'-(3-chloro-4-methoxyphenyl)-N,N-dimethylurea [19937-59-8]	
Monolinurón	C ₉ H ₁₁ ClN ₂ O ₂	N'-(4-chlorophenyl)-N-methoxy-N-methylurea [1746-81-2]	

Estos compuestos presentan propiedades herbicidas que varían notablemente con la presencia de elementos halógenos en la molécula.

Tabla VI.C.2. Algunas propiedades físico-químicas de los compuestos estudiados [1].

Compuesto	Solubilidad en agua (mg L ⁻¹ , 20°C)	log k _{ow}	PKa	presión de vapor mPa (25°C)	k _{oc} (ml g ⁻¹)	log k _{oc}
Bromacil	815	1,88	9,27	0,041	32	1,51
Cloroxurón	3,7	3,4	-	0,000230	2820	3,45

Compuesto	Solubilidad en agua (mg L ⁻¹ , 20°C)	log k _{ow}	PKa	presión de vapor mPa (25°C)	k _{oc} (ml g ⁻¹)	log k _{oc}
Clortolurón	74	2,5	-	0,005	205	2,31
Dimefurón	16	2,51	-	0,01	206	2,31
Diurón	35,6	2,87	-	0,00115	1067	3,03
Etidimurón	3000	-0,22	-	0,000008	-	-
Isoproturón	70,2	2,50	-	0,0055	122	2,09
Linurón	63,8	3,00	-	5,10	620	2,79
Lufenurón	0,046	5,12	10,2	0,004	41182	4,61
Metabromurón	330	2,41	-	0,40	197	2,29
Metabenztiaturón	60	2,64	-	0,0059	527	2,72
Metoxurón	678	1,6	-	4,3	120	2,08
Monolinurón	735	2,20	-	0,0064	200	2,30

La mayoría de las ureas sustituidas tienen muchas características en común con las triazinas, pero su persistencia en el suelo tiende a ser menor (3 a 6 meses). Por otra parte, los uracilos tienden a ser lixiviados más fácilmente, lo que propicia su uso en cultivos de especies con raíces profundas y son menos selectivos. Su solubilidad en agua y adsorción a los coloides del suelo están influidos por el número de átomos de cloro en la molécula. El linurón, diurón y cloroxurón son altamente persistentes en suelos como se puede deducir al observar sus valores de K_{ow} y K_{oc} , éste particularmente elevado en el caso de los dos últimos compuestos citados, [2] y pueden resultar tóxicos para otras plantas en cultivos de rotación [3]; por otra parte el isoproturón se retiene poco, al igual que el bromacil y se detectan fácilmente en aguas subterráneas y de superficie [4].

Observando la tabla anterior, resalta el alto valor de K_{oc} que presenta el lufenurón, que es potencialmente retenido en suelos. Esto unido a la baja solubilidad en agua y el carácter marcadamente apolar hace que no sufra apenas lixiviación [5].

3. PRODUCCIÓN Y USOS

Tabla VI.C.3. Principales usos de las ureas estudiadas [1, 3, 6, 7]

Compuesto	Tipo de pesticida	Modo de acción	Aplicación sobre cultivos	Especies diana	Tipo de tratamientos	Cultivos tratados
Bromacil	De amplio espectro	Sistémico	Absorbido por raíces	Contra especies perennes	Preemergencia y postemergencia	Alfalfa maíz cítricos, semillas
Cloroxurón	Herbicida no selectivo	De contacto	Tratamiento en semillas	Mono y dicotiledóneas	Preemergencia	Cultivos forrajeros, cereales y frutales
Clortolurón	Herbicida selectivo	Sistémico	Absorbido por raíces y hojas	Especies dicotiledóneas perennes	Preemergencia y postemergencia	Trigo, cebada y semillas.
Dimefurón	Herbicida selectivo	Sistémico	Absorbido por raíces	Malezas de tipo gramíneas.	Preemergencia y postemergencia	Algodón, cereales y frutales
Diurón	Herbicida selectivo	Sistémico	Absorbido por raíces	Herbaceas, gramíneas y arbustos	Preemergencia	Cereales y hortalizas
Etidimurón	Herbicida selectivo	Residual	Acción sobre semillas y raíces	Arbustos y plantas silvestres	Preemergencia	Arboles frutales y uso forestal
Isoproturón	Herbicida selectivo	Sistémico	Absorbido por raíces y hojas	Malas hierbas de hoja ancha y gramíneas	Preemergencia y postemergencia	Cereales como trigo o cebada
Linurón	Herbicida selectivo	Sistémico, residual	Absorbido por raíces	Malas hierbas de tipo gramíneas, arbustos o plantas silvestres	Preemergencia y postemergencia	Cereales y leguminosas
Lufenurón	Insecticida ovicida selectivo	Sistémico de acción estomacal	Aplicación en superficie	Artrópodos en estado larval, insectos masticadores.	-	Cultivos de frutales y hortalizas
Metabromurón	Herbicida selectivo	Sistémico	Absorbido por raíces y para tratamiento de semillas.	Control de hierbas y malezas	Preemergencia y postemergencia	Cereales y leguminosas
Metabenzthiazurón	De amplio espectro	Sistémico, de contacto y residual	Absorbido por las raíces y hojas	Control de hierbas como poa	Preemergencia y postemergencia	Cultivos cereales

Compuesto	Tipo de pesticida	Modo de acción	Aplicación sobre cultivos	Especies diana	Tipo de tratamientos	Cultivos tratados
Metoxurón	Selectivo	Sistémico, de contacto y residual	Absorbido por las raíces y hojas	Control de malezas y gramíneas	Preemergencia y postemergencia	Cultivo de cereales, como trigo, y hortalizas (zanahoria)
Monolinurón	Selectivo	Sistémico	Absorbido por las raíces y hojas	Algas, gramíneas	Preemergencia y postemergencia	Cultivos de cereales y de leguminosas

Son todos productos herbicidas a excepción del lufenurón que tiene acción insecticida puesto que pertenece a las benzoilureas que, como ya se apuntó al principio de este apartado, tienen actividad insecticida. Los de acción herbicida, se utilizan fundamentalmente como esterilizantes, en terrenos donde se quiere evitar el crecimiento de todo tipo de plantas y en tratamientos de preemergencia y postemergencia temprana.

4. TOXICIDAD

Los pesticidas pertenecientes a este grupo, estudiados en esta Tesis, son compuestos que actúan como **inhibidores de la fotosíntesis**, y además pueden **desorganizar membranas celulares**. Los síntomas fitotóxicos se observan principalmente en las hojas: en dosis moderadas se produce una ligera clorosis foliar que se va desarrollando lentamente, mientras que en dosis elevadas las hojas presentan manchas y a los pocos días se necrosan. [8]

4.1. ABSORCIÓN Y DISTRIBUCIÓN.

La acción fisiológica, absorción y translocación de las fenilureas y uracilos es **similar a la de las triazinas**. Son en general fácilmente absorbidos por raíces y rápidamente translocados hacia las partes superiores de las plantas vía apoplasto. En las aplicaciones que se hacen a las hojas son translocados por la misma vía pero en una proporción mucho menor.

4.2. MECANISMO DE ACCIÓN

Al igual que las triazinas actúan inhibiendo el proceso de fotosíntesis afectando al fotosistema II. Las sulfonilureas, como nicosulfuron o chlorsulfuron, afectan a la función fotosintética de las plantas mediante la inhibición de una enzima llamada acetolactato sintetasa (ALS) que afecta a la biosíntesis de aminoácidos de cadenas ramificadas y a la producción de azúcares en la planta [9].

4.3. ELIMINACIÓN

La degradación de las ureas en el suelo es principalmente **microbiológica**. Los organismos implicados en este proceso son bacterias y hongos que pueden usar algunas ureas sustituidas como fuente de energía, mediante reacciones de conjugación y metabolización que producen desalquilación de las moléculas.

4.4. TOXICIDAD EN HUMANOS

Aunque la toxicidad demostrada para humanos expuestos a estos compuestos bajo su uso normal no es elevada, algunos de ellos como el linurón o diurón se cree que puedan tener efectos sobre la reproducción, fertilidad o actuar como disruptores endocrinos, mientras que otros como el isorpoturón se sospecha que pueda tener efectos cancerígenos a nivel hepático [3, 8-14].

4.5. TOXICIDAD EN ORGANISMOS NO-DIANA

En general su toxicidad en mamíferos es reducida, así como en insectos, aves y peces, si bien debido a su alta persistencia en suelos, pueden afectar a cultivos en prácticas de rotación. Una vez son lixiviados y pasan a los acuíferos, pueden llegar a presentar efectos tóxicos sobre algas y especies acuáticas como por ejemplo bromacil, cloroxuron [4, 7], o efectos tóxicos severos como el linurón [14, 15]. Algunos como el metabenzthiazurón resultan altamente tóxicos para las abejas [16].

5. DISTRIBUCIÓN EN EL MEDIOAMBIENTE

Son **relativamente persistentes en los suelos** en donde pueden permanecer durante un período de 3 a 6 meses bajo condiciones de humedad y temperatura favorables, con poca o ninguna lixiviación. Muchas de ellas se fotodescomponen y son sensibles a la acción microbiana. La mayoría de las ureas son además termolábiles por lo que la temperatura del medio afecta a su descomposición [1, 3].

En algunos casos se lixivian fácilmente, tal y como se puede deducir de los valores de solubilidad y K_{ow} presentados en la tabla VI.C.2, contaminando acuíferos además de suelos, estando en algunos casos catalogadas como peligrosas para el medioambiente. Tanto isoproturón como diurón se encuentran incluidos en la lista de las 33 sustancias prioritarias en aguas.

5.1. APLICACIÓN A CULTIVOS

Se aplican normalmente al suelo cultivable antes de la plantación, en forma de emulsiones líquidas o por fumigación. En tratamientos de postemergencia, la aplicación más común es mediante fumigado del compuesto diluido en agua o disolventes adecuados para su aplicación.

5.2. TRANSPORTE, REPARTO Y ACUMULACIÓN.

No tienen en general alta tendencia a lixiviarse de hecho, presentan una alta residualidad en suelos, incluso bajo condiciones que favorecerían la lixiviación (lluvias fuertes, pH ácido o temperaturas altas), puesto que se adsorben con cierta facilidad sobre todo en arcillas y materia orgánica, por lo que están presentes en suelos, medio en el cual su degradación está favorecida.

5.3. TRANSFORMACIÓN Y DEGRADACIÓN

Las fenilureas presentes en el suelo se transforman mediante procesos de desmetilación enzimática y microbiana que afectan al átomo de N, y también por hidroxilación que se produce en la posición 2 del anillo bencénico. Los procesos de degradación están favorecidos a pH neutro-básico.

6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] <<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/es/index.htm>> (Consulta: 20-01-10).
- [2] Environment, Fish & Wildlife <http://www.efw.bpa.gov/environmental_services/Document_Library/Vegetation_Management/sheets/Diuron.pdf> (Consulta: 21-02-2010)
- [3] EXTTOXNET <<http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/extoxnet/pyrethrins-ziram/index.html>> (Consulta: 18-02-2010)
- [4] <<http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/0041red.pdf>> (Consulta: 19-02-2010)
- [5] Vademecum 2009 <http://www.terralia.com/vademecum_de_productos_fitosanitarios_y_nutricionales/index.php?proceso=registro&numero=147&base=2009> (Consulta: 27-04-2010).
- [6] <http://www.infoagro.com> (Consulta: 27-04-2010).
- [7] <http://www.pesticideinfo.org/Detail_Chemical.jsp?Rec_Id=PC33602Movimiento> (Consulta: 20-02-2010)
- [8] Labrada, R.; Casely, C.; Parker, C.; “Manejo de malezas para países en desarrollo”; Estudio FAO producción y protección Vegetal – 120. Organización de Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma, **1996**
- [9] Saari, L.; Cotterman, J.; Primiani, M.; Mechanism of sulfonylurea herbicide resistance in the broadleaf weed, kochia scoparia; *Plant Physiol.*; 93, **1990**, pp. :55-61.
- [10] <<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/Reports/151.htm>> (Consulta: 20-02-2010)
- [11] <http://www.epa.gov/pesticides/reregistration/REDs/diuron_red.pdf> (Consulta: 20-02-2010)
- [12] “The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification : 2004” World Health Organization **2005**
- [13] Isoproturon in Drinking-water: Guidelines for drinking-water quality. World Health Organization (Ginebra, Suiza), **1996**.

- [14] <<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/Reports/419.htm> > (Consulta: 21-02-2010)
- [15] <<http://msds.chem.ox.ac.uk/LI/linuron.html>> (Consulta: 20-02-2010)
- [16] <<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/en/Reports/452.htm>> (Consulta: 18-02-2010).

VI.D. PIRETROIDES

1. INTRODUCCIÓN.....	- 358 -
2. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS.....	- 358 -
3. PRODUCCIÓN Y USOS	- 361 -
4. TOXICIDAD.....	- 363 -
4.1. ABSORCIÓN Y DISTRIBUCIÓN.....	- 363 -
4.2. MECANISMO DE ACCIÓN.....	- 364 -
4.3. ELIMINACIÓN.....	- 365 -
4.4. TOXICIDAD EN HUMANOS.....	- 365 -
4.5. TOXICIDAD EN ORGANISMOS NO-DIANA	- 366 -
5. DISTRIBUCIÓN EN EL MEDIOAMBIENTE.....	- 366 -
5.1. APLICACIÓN A CULTIVOS	- 366 -
5.2. TRANSPORTE, REPARTO Y ACUMULACIÓN.....	- 366 -
5.3. TRANSFORMACIÓN Y DEGRADACIÓN.....	- 367 -
6. BIBLIOGRAFÍA	- 368 -

1. INTRODUCCIÓN

Las **piretrinas** son compuestos naturales que tienen propiedades insecticidas y que se encuentran en el extracto de piretro de ciertas flores de crisantemos cultivadas sobre todo en África y Asia. [1, 2]. Químicamente son ésteres de ácidos carboxílicos (crisantémico y pirétrico) y tres quetoalcoholes (piretrolona, jasmolona y cinerolona) de forma que de la combinación de cada uno de los ácidos con los tres quetoalcoholes, surgen las 6 piretrinas. Como agroquímico tienen muchas ventajas puesto que su toxicidad para el hombre, y para mamíferos es muy baja y apenas producen resistencia en los insectos; pero a la vez, presentan un gran inconveniente, y es que no resultan persistentes en el medio puesto que se descomponen rápidamente bajo la acción de la luz solar y del aire, disminuyendo su efectividad a la hora de proteger los cultivos [3].

Para intentar aumentar la fotorresistencia, surgieron algunos compuestos sintéticos que se denominaron **piretroides**, basados en las piretrinas con modificaciones importantes en la estructura inicial, de forma que resultan más efectivos puesto que son fotoquímicamente más estables, pero también más tóxicos [4].

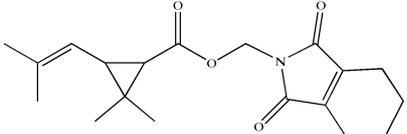
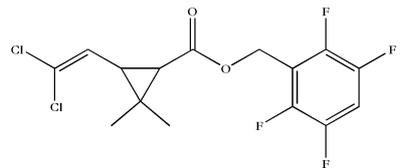
2. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

Los piretroides son ésteres sintéticos derivados de la piretrinas. Según su estructura (que condicionará sus propiedades) se pueden clasificar en dos grupos, en concreto en función del sustituyente del grupo éster: los del **tipo II** se refieren a aquellos piretroides que presentan un grupo **α -ciano** en su estructura básica [5], mientras que los de **tipo I**, engloban un conjunto de sustancias muy amplio, siendo habitual la presencia del grupo **alcohol**. Para ambos tipos de piretroides, resulta frecuente la presencia de un grupo **3-fenoxibencilo** como sustituyente del éster..

En este trabajo se han estudiado 8 compuestos pertenecientes a la familia de los piretroides, determinados en muestras de suelos agrícolas.

Tabla VI.D.16. Identificación de los piretroides estudiados en esta Tesis [6].

Compuesto Fórmula	Nombre CAS [Número CAS]	Estructura
Bifentrina C ₂₃ H ₂₂ ClF ₃ O ₂	(2-methyl[1,1'-biphenyl]-3-yl)methyl (1R,3R)-rel-3-[(1Z)-2-chloro-3,3,3-trifluoro-1-propenyl]-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate [82657-04-3]	
Bioaletrina C ₁₉ H ₂₆ O ₃	2-methyl-4-oxo-3-(2-propenyl)-2-cyclopenten-1-yl (1R,3R)-2,2-dimethyl-3-(2-methyl-1-propenyl)cyclopropanecarboxylate [28057-48-9]	
Cifentrina C ₂₄ H ₂₅ NO ₃	cyano(3-phenoxyphenyl)methyl 2,2-dimethyl-3-(2-methyl-1-propenyl)cyclopropanecarboxylate [39515-40-7]	
λ-cihalotrina C ₂₃ H ₁₉ ClF ₃ NO ₃	(R)-cyano(3-phenoxyphenyl)methyl (1S,3S)-rel-3-[(1Z)-2-chloro-3,3,3-trifluoro-1-propenyl]-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate [91465-08-6]	
Cipermetrina C ₂₂ H ₁₉ Cl ₂ NO ₃	cyano(3-phenoxyphenyl)methyl 3-(2,2-dichloroethenyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate [52315-07-8]	
Empentrina C ₁₈ H ₂₆ O ₂	1-ethynyl-2-methyl-2-pentenyl 2,2-dimethyl-3-(2-methyl-1-propenyl)cyclopropanecarboxylate [54406-48-3]	
Permetrina C ₂₁ H ₂₀ Cl ₂ O ₃	(3-phenoxyphenyl)methyl 3-(2,2-dichloroethenyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate [52645-53-1]	
Teflutrina C ₁₇ H ₁₄ ClF ₇ O ₂	(2,3,5,6-tetrafluoro-4-methylphenyl)methyl (1R,3R)-rel-3-[(1Z)-2-chloro-3,3,3-trifluoro-1-propenyl]-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate [79538-32-2]	

Compuesto Fórmula	Nombre CAS [Número CAS]	Estructura
Tetrametrina C ₁₉ H ₂₅ NO ₄	(1,3,4,5,6,7-hexahidro-1,3-dioxo-2H-isoindol-2-yl)methyl 2,2-dimethyl-3-(2-methyl-1-propenyl)cyclopropanecarboxylate [7696-12-0]	
Transflutrina C ₁₅ H ₁₂ Cl ₂ F ₄ O ₂	(2,3,5,6-tetrafluorophenyl)methyl (1R,3S)-3-(2,2-dichloroethenyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate [118712-89-3]	

Comúnmente se formulan con **butóxido de piperonilo (PBO)** que actúa como sinergista en los preparados comerciales, potenciando la actividad insecticida de los principios activos del producto aplicado o mitigando la descomposición de los mismos, y forman parte de preparados en presencia de otros piretroides y organofosforados normalmente [7, 8].

Estos compuestos suelen presentar de 1 a 3 **carbonos quirales** en su estructura, por lo que en las mezclas comerciales están presentes distintos **isómeros** del compuesto original. Éstos difieren mucho entre sí en su acción insecticida y su toxicidad. Por ejemplo, el isómero más activo del aletrín es 150 veces más efectivo contra las moscas que el isómero de menor acción fitosanitaria [9].

Tabla VI.D.2. Algunas propiedades físico-químicas de los compuestos estudiados [6]

Compuesto	Solubilidad en agua (mg L ⁻¹ , 20°C)	log k _{ow}	PKa	presión de vapor mPa (25°C)	k _{oc} (ml g ⁻¹)	log k _{oc}
Bifentrina	0,0010	7,30	-	0,0178	236610	5,37
Bioaletrina	4,6000	4,68	-	43,90	9500	3,98
Cifenoctrina	0,0100	6,62	-	0,12	9224	3,96
λ-cihalotrina	0,0050	6,90	-	0,0002	157000	5,20
Cipermetrina	0,0090	5,30	-	0,00023	85572	4,93

Compuesto	Solubilidad en agua (mg L ⁻¹ , 20°C)	log k _{ow}	PKa	presión de vapor mPa (25°C)	k _{oc} (ml g ⁻¹)	log k _{oc}
Empentrina	0,1100	6,21	-	14,00	-	
Permetrina	0,2000	6,10	-	0,002	100000	5,00
Teflutrina	0,0160	6,40	9,00	8,40	11300	4,05
Tetrametrina	1,8300	4,60	-	2,10	1423	3,15
Transflutrina	0,0570	5,46	-	0,90	-	

Como se puede ver en la tabla anterior, una característica común a esta familia de compuestos es su baja solubilidad y su relativamente alta lipofilia, aunque lo que más llama la atención es el valor de K_{oc}, que indica que son fuertemente retenidos en suelos y poco lixiviados, por lo que no se espera que la concentración presente en acuíferos sea importante [10] Sin embargo, pueden ser arrastrados por las aguas de escorrentía y aguas de lluvia, contaminando también las aguas superficiales, aunque la presencia en aguas de ríos es muy poco probable, tal y como se desprende de un artículo publicado recientemente por *Barceló et al.* [11] en donde solamente cipermetrina fue detectada en el río Ebro a un nivel de concentración de entre 5 y 30 ng L⁻¹.

3. PRODUCCIÓN Y USOS

Las piretrinas y piretroides han sido ampliamente utilizadas después de que la toxicidad de organoclorados se pusiera de manifiesto, suponiendo una alternativa junto con los pesticidas organofosforados para la protección de cultivos, la eliminación de insectos no beneficiosos y el control de transmisión de enfermedades [9].

Los piretroides de tipo II son más inestables por lo que su uso más recomendado se encuentra confinado al ámbito doméstico. En cuanto a los piretroides de tipo I, son más estables químicamente lo que los hace más efectivos como agroquímicos. El grupo **α-ciano-3-**

fenoxibencil, aumenta la actividad insecticida aproximadamente por un factor de 10 [5] (por ejemplo, estudiados en esta Tesis, permetrina frente a cipermetrina).

Se resumen a continuación los usos más frecuentes de los piretroides estudiados en este trabajo, así como el modo de actuación de los mismos.

Tabla VI.D.3. Principales usos de las piretroides estudiados [6, 12-16].

Compuesto	Tipo de plaguicida	Modo de acción	Tipo de acción	Especies diana	Aplicación
Bifentrina	Ovicida insecticida	No sistémico	Estomacal y por contacto	Ácaros, arañas mosca y piulgón	Cultivos hortofrutícolas y a nivel doméstico
Bioaletrina	Insecticida	No sistémico	Estomacal y por contacto	Moscas mosquitos, hormigas	Uso doméstico y de salud pública.
Cifenotrina	Insecticida, acaricida	No sistémico	Estomacal y por contacto	Cucarachas, arañas, hormigas, moscas	Uso doméstico. Aplicación a animales como caballos o perros.
Cipermetrina	Insecticida	No sistémico, residual	Estomacal y por contacto	Hormigas, cucarachas moscas mosquitos y polillas	Uso agrícola, industrial y urbano. Cultivos forrajeros, de cereales y hortofrutícolas
Empentrina	insecticida	No sistémico	Estomacal y por contacto	Polillas	Uso industrial
λ -cihalotrina	Insecticida	No sistémico	Estomacal y por contacto	Orugas, pulgas, escarabajos	Uso agrícola sobre frutales, hortalizas, leguminosas y cereales
Permetrina	Insecticida, acaricida	De amplio espectro	Por inhalación y por contacto	Piojos, pulgas, garrapatas, moscas	Uso doméstico. Aplicación a animales domésticos, plantas ornamentales y en el ámbito de salud pública
Teflutrina	Insecticida	No sistémico	Por inhalación y por contacto	Moscas, orugas	Cultivos agrícolas. Puede aplicarse al suelo en presiembra
Tetrametrina	Insecticida, acaricida	No sistémico	Por contacto	Cucarachas, hormigas, pulgas, ácaros	Uso doméstico y de salud pública
Transflutrina	Insecticida, acaricida	De amplio espectro	Por inhalación y por contacto	Moscas, escarabajos, ácaros, polillas	Uso doméstico y de salud pública. A nivel agrícola, en cultivos hortofrutícolas y de cereales

Muchos de estos compuestos se usan en el ámbito doméstico para controlar insectos que afectan a animales de compañía o al ganado [1] ya que, debido a la fotólisis que sufren, en muchas ocasiones el uso a nivel agrícola de estos preparados no está muy recomendado. Las piretrinas son compuestos que abarcan una gran cantidad de especies diana y su uso en el ámbito doméstico está muy recomendado debido a su rápida acción por contacto, baja toxicidad para mamíferos, bajo riesgo de aparición de resistencias y amplio espectro de actividad [1, 3]. Los piretroides sintéticos, aunque son de acción más específica, en general

también son utilizados sobre multitud de plagas, y con usos muy diversos, desde salud pública, hasta uso doméstico e industrial, pasando por protección de cultivos a nivel agrícola y forestal.

4. TOXICIDAD

La toxicidad de los estos pesticidas depende en gran medida de la estereoquímica que presentan sus moléculas. Los piretroides contienen un ciclopropano en su estructura básica que posibilita la existencia de 4 isómeros de la combinación de las conformaciones cis-trans y R/S. Además existe otro centro que posibilita la existencia de actividad óptica en aquellos piretroides de tipo II; se trata del carbono unido al grupo ciano, de forma que se posibilita la existencia de hasta 16 isómeros del mismo compuesto, cada uno de ellos con un grado de acción insecticida y toxicidad distintos [4]

Las conformaciones 1R en el anillo ciclopropano resultan más tóxicas que las 1S, y por otra parte, los isómeros cis presentan más acción plaguicida que los trans, siendo más tóxicos para mamíferos. Además los piretroides de tipo II presentan otro centro quiral en el carbono de la cadena lateral unido al grupo ciano. En este caso, la conformación S es más potente como plaguicida que la R [1].

La toxicidad de los preparados comerciales dependerá de la proporción de cada uno de los isómeros en el formulado final. Además, los metabolitos y productos de degradación pueden tener efectos tóxicos, a veces mayores que el compuesto padre [4].

4.1. ABSORCIÓN Y DISTRIBUCIÓN.

Debido a que son compuestos ampliamente utilizados en el ámbito doméstico, la exposición a estas sustancias se produce sobre todo por el uso de productos de higiene en el

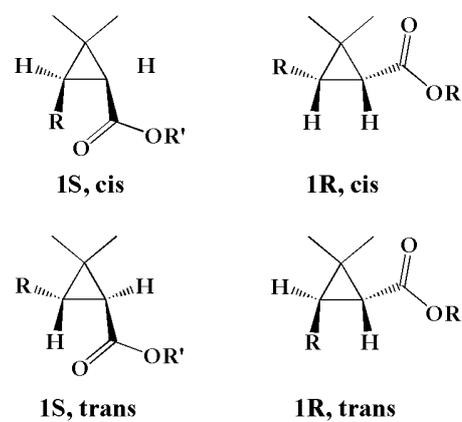


Figura VI.D.1. Isomería en el anillo ciclopropano

hogar que contienen piretrinas y piretroides, por ejemplo insecticidas, aerosoles, champús o repelentes para mosquitos que pueden aplicarse sobre la ropa [1].

Las vías de entrada más importantes en organismos superiores son la **respiratoria** y la **digestiva**, si bien exposición por vía **dérmica**, a pesar de ser mucho más lenta, tiene relevancia cuando se utilizan estos compuestos en relación a cuestiones de salud pública y en el campo de la agricultura y sobre todo.

4.2. MECANISMO DE ACCIÓN

Los piretroides ejercen su acción pesticida afectando principalmente a la generación de impulsos nerviosos tanto dentro del sistema nervioso central como del periférico [5].

En este caso la acción tóxica se logra por la disrupción de la permeabilidad de las membranas nerviosas a los átomos de sodio, lo que repercute directamente en la transmisión neuronal por inactividad de la bomba de sodio-potasio.

Estos compuestos afectan sobre todo a insectos, teniendo poco impacto sobre mamíferos debido principalmente al tipo de neurotransmisión de los insectos, a la limitada absorción dérmica por parte de mamíferos y a la existencia en éstos de enzimas hepáticas que degradan rápidamente las piretrinas y piretroides; además afecta positivamente el hecho de la temperatura corporal de ambos organismos: la sangre en los insectos tiene una temperatura de unos 10°C inferior a la de los mamíferos, y el efecto tóxico de estos compuestos se ve favorecido a temperaturas bajas en los organismos [4, 9, 10].

Los signos típicos de intoxicación por los piretroides de tipo II incluyen hiperexcitabilidad y convulsiones en insectos, mientras que los de tipo I causan principalmente ataxia y descoordinación, actuando en tiempos muy cortos (de 1 a 2 minutos) con la consecuencia de pérdida de locomoción.

En mamíferos los de tipo I producen temblores de todo el cuerpo (**síndrome T**), mientras que los de tipo II producen coreoatetosis y salivación (**síndrome CS**) [5]. La intoxicación con piretroides resulta de sus potentes efectos sobre la generación de impulsos nerviosos tanto dentro del sistema nervioso central como del periférico

4.3. ELIMINACIÓN

En los organismos se metabolizan a nivel estomacal y hepático, a través de reacciones de reducción e hidrólisis del enlace éster, produciendo una gran variedad de metabolitos que son excretados en heces y orina.

4.4. TOXICIDAD EN HUMANOS

La ingestión de alimentos contaminados supone una de las vías de entrada más importante de estos pesticidas al organismo. La absorción dérmica es mucho menor que la absorción por inhalación y apenas tiene importancia [7, 8]. Una vez absorbidas se distribuyen por distintos tejidos, sobre todo hacia aquellos más lipofílicos.

Hay varios factores que determinan los efectos de estos compuestos sobre la salud, como pueden ser los hábitos alimenticios o problemas asociados a la respiración. Tanto piretrinas como piretroides tienen una baja toxicidad crónica para humanos, residiendo la mayor problemática asociada a alergias y la función respiratoria. La exposición de humanos a cualquiera de los dos tipos de piretroides puede causar parestesia, una sensación de quemazón o picazón de la piel, pero este efecto es más intenso con los compuestos del Tipo 2 [5]. Los efectos que estos compuestos tienen sobre los humanos no están todavía muy determinados, pero aún así, la EPA ha clasificado algunos de ellos (cipermetrina, permetrina y bifentrina) como posibles carcinógenos para humanos [11].

No hay ninguna evidencia de que las piretrinas o los piretroides afectan la capacidad de reproducción en seres humanos, pero algunos estudios en animales han demostrado una reducción de la fertilidad en machos y hembras [1] y se sospecha que algunos piretroides y sus productos de degradación pueden actuar como disruptores endocrinos [17, 18]

En general estos compuestos resultan menos tóxicos que los pesticidas organofosforados, organoclorados o carbamatos utilizados ampliamente como fitosanitarios, si bien existen excepciones como el caso de, teflutrina o cihalotrina, que presentan toxicidades agudas superiores.

No se ha observado la bioacumulación de estos compuestos ni sus metabolitos a pesar de la gran lipofilia que presentan [19], si bien alguna de las piretrinas y la aletrina pueden bioamplificarse a lo largo de la cadena trófica.

Usadas en cantidades recomendadas, las piretrinas no son apenas tóxicas para el hombre. En cuanto a los piretroides, sí presentan un comportamiento tóxico más importante aunque se estima que menos del 2% de la dosis aplicada puede pasar a organismos superiores [1, 7].

4.5. TOXICIDAD EN ORGANISMOS NO-DIANA

Los mecanismos de acción de estos pesticidas son los mismos tanto para insectos como para mamíferos, pero las transmisiones neurológicas en estos últimos se producen por otras vías, por lo que los efectos tóxicos solamente resultan importantes en el caso de organismos invertebrados inferiores tales como arañas, insectos, hormigas... Los piretroides halogenados suelen presentar una toxicidad más elevada para mamíferos que aquellos que no presentan átomos de Cl, Br o F en su estructura.

Las piretrinas y piretroides son muy tóxicos para las especies acuáticas, y la toxicidad aumenta con el incremento de la temperatura y la acidez del medio. Resultan ligeramente tóxicos para pájaros y afectan a insectos beneficiosos como las abejas.

5. DISTRIBUCIÓN EN EL MEDIOAMBIENTE

5.1. APLICACIÓN A CULTIVOS

Se aplican por fumigación en la superficie foliar de la planta o en emulsiones directamente en el suelo. A nivel doméstico se suelen encontrar en forma de polvos o sprays o formando parte de champús con acción específica contra piojos.

5.2. TRANSPORTE, REPARTO Y ACUMULACIÓN.

Como ya se ha apuntado anteriormente, se trata de unos compuestos muy lipofílicos y con baja solubilidad en agua lo que hace que se retengan en el suelo. Normalmente se aplican en forma de sprays a nivel doméstico y por fumigación aérea a nivel agrícola, lo que hace que la presencia en el aire sea alta tras su aplicación, si bien se descompone rápidamente en este

medio. Además, si la aplicación es en superficie, puede ser arrastrado por el agua de lluvia hasta acuíferos superficiales.

5.3. TRANSFORMACIÓN Y DEGRADACIÓN

Como ya se ha deducido a tenor de las propiedades físico-químicas presentes en la tabla VI.D.2, estos pesticidas se adhieren firmemente al suelo y eventualmente son degradados por microorganismos. Sin embargo en el aire, las seis piretrinas y muchos de los piretroides son degradados rápidamente (1-2 días) en un proceso activado por la luz solar o por otros compuestos que se encuentran en la atmósfera [1], comenzando en el grupo alcohol y derivando en la formación de numerosos productos de ruptura desconocidos [3]. Los piretroides también se descomponen en agua formando productos no tóxicos. Por otra parte las piretrinas además se descomponen por la acción de ácidos y álcalis [19].

6. BIBLIOGRAFÍA

[1] Toxicological profile for pyrethrins and pyrethroids, US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), Atlanta, GA, **2003**.

[2] <<http://www.epa.gov/oppsrrd1/reevaluation/pyrethroids-pyrethrins.html>> (Consulta: 10-03-2010)

[3] Vademecum 2009: piretrinas naturales <http://www.terralia.com/vademecum_de_productos_fitosanitarios_y_nutricionales/index.php?proceso=registro&numero=1190&base=2009>

[4] Mueller-Beilschmidt, D.; The toxicology and environmental fate of syntheticpyrethroids; *J. Pestic. Reform*, 10, **1990**, pp. 32-38.

[5] <<http://ipmworld.umn.edu/cancelado/Spchapters/BloomquistSp.htm>> (Consulta : 09-03-2010)

[6] <<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/es/index.htm>> (Consulta: 10-03-2010)

[7] Jones, D.; “Piperonyl butoxide: the insecticide synergist”; Academic Press (Londres, UK), **1998**

[8] Menéndez, F.; *Estudio de riesgos higiénicos en procesos específicos: plaguicidas* en Higiene industrial. Manual para la formación del especialista”; Lex Nova (Valladolid, España), **2006**, pp. 459- 469.

[9] Committee on Gulf War and Health: Literature Review of Pesticides and Solvents “Gulf War and Health, Volume 2: Insecticides and Solvents” The National Academies Press Washington, USA), **2002**; pp57-63

[10] Kamrin, M.; “Pesticide profiles: toxicity, environmental impact, and fate”

[11] Feo, M.; Eljarrat, E.; Barceló, D.; A rapid and sensitive analytical method for the determination of 14 pyrethroids in water samples; *J. Chromatogr. A*; 1217, **2010**, pp. 2248-2253.

[12] Talstar®Xtra, etiqueta del producto comercial (FMC) <<http://www.fmcagroquimica.com.mx/Productos/Insecticidas/TalstarXtraControl.aspx>> (Consulta: 20-03-2010)

[13] Vademecum <http://www.terralia.com/agroquimicos_de_mexico/index.php?proceso=registro&numero=5336&base=2009> (Consulta: 10-03-2010)

[14] Giménez, R.; Della, A; Odello, E.; Toxic effects of the insecticides chlorpyrifos and tefluthrin on earthworms (*Lumbricus terrestris* L.); *Agric. Téc.*; 64, **2004**, pp. 347-352

[15] <http://epa.gov/oppsrrd1/registration_review/cyphenothrin/index.html> (Consulta: 16-03-2010)

[16] Vademecum <http://www.terralia.com/vademecum_de_productos_fitosanitarios_y_nutricionales/index.php?proceso=registro&numero=50> (Consulta: 10-03-2010)

[17] Safety Source for Pest Management, Beyond Pesticides Least Toxic Service Directory.Pyrethroids/Pyrethrins.<<http://www.beyondpesticides.org/infoservices/pesticidefactsheets/toxic/pyrethroid.htm>> (Consulta: 05-03-2010)

[18] Tyler, C.; Beresford, N.; Van der Woning, M.; Sumpter, J.; Thorpe, K.; Metabolism and environmental degradation of pyrethroid insecticides produce compounds with endocrine activities; *Environ. Toxicol. Chem.*; 19, **2000**, pp. 801-809.

[19] EXTOXNET- Extension Toxicology Network <<http://extoxnet.orst.edu/pips/pyrethri.htm>> (Consulta: 10-03-2010)

VI.E. OTROS PESTICIDAS ORGÁNICOS

1. HERBICIDAS ÁCIDOS.....	- 372 -
2. AMIDAS SUSTITUIDAS.....	- 376 -
3. NEONICOTINOIDES	- 378 -
4. FENILPIRAZOL.....	- 380 -
5. NITRILOS	- 383 -
6. OTROS HETEROCICLOS ESTUDIADOS.	- 384 -
7. BIBLIOGRAFÍA	- 389 -

Son multitud los compuestos orgánicos utilizados como fitosanitarios. Entre los más importantes, además de los grupos de los organoclorados, organofosforados y piretroides se encuentra el amplio grupo de los organonitrogenados, en el que se incluyen muchas familias de compuestos con características físico-químicas y actividad plaguicida muy diferentes debido a la gran diversidad de grupos funcionales que se conocen con base nitrogenada. Además hay sustancias pertenecientes al grupo de los organosulfurosos que también se utilizan ampliamente en control de plagas, aunque comprende menor número de compuestos que los grupos anteriores.

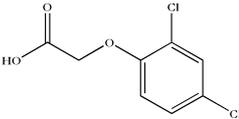
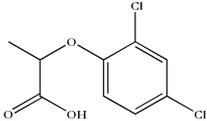
Algunas de los pesticidas que se han estudiado en este trabajo, además de los citados en apartados anteriores, pertenecen a las familias de amidas, carbamatos, neonicotinoides, nitrilos, benzofuranos, quinolinas y pirazoles, o derivados de ácidos entre otros.

1. HERBICIDAS ÁCIDOS

Esta familia de compuestos engloba aquellos pesticidas derivados de ácidos, normalmente de tipo fenoxi o oxifenoxiácidos. De todos ellos el más conocido y aplicado es el 2,4-D que, junto con el MCPA, ha sido usado durante años en grandes volúmenes en todo el mundo.

Se recogen a continuación las estructuras de 6 herbicidas ácidos estudiados en esta Tesis.

Tabla VI.E.1. Identificación de los herbicidas ácidos estudiados [1].

Compuesto	Formula Molecular	Nombre CAS [Número CAS]	Estructura
2,4-D	$C_8H_6Cl_2O_3$	(2,4-dichlorophenoxy)acetic acid	
Diclorprop	$C_9H_8Cl_2O_3$	2-(2,4-dichlorophenoxy)propanoic acid	

Compuesto	Formula Molecular	Nombre CAS [Número CAS]	Estructura
Fluazifop	C ₁₅ H ₁₂ F ₃ NO ₄	2-(4-((5-(trifluoromethyl)-2-pyridinyl)oxy) phenoxy)propanoic acid [69335-91-7]	
Fluroxipir	C ₇ H ₅ Cl ₂ FN ₂ O ₃	[(4-amino-3,5-dichloro-6-fluoro-2-pyridinyl)oxy]acetic acid [69377-81-7]	
Haloxifop	C ₁₅ H ₁₁ ClF ₃ N ₂ O ₄	2-[4-[[3-chloro-5-(trifluoromethyl)-2-pyridinyl]oxy]phenoxy]propanoic acid [69806-34-4]	
MCPA	C ₉ H ₉ ClO ₃	(4-chloro-2-methylphenoxy)acetic acid [94-74-6]	
Mecoprop	C ₁₀ H ₁₁ ClO ₃	2-(4-chloro-2-methylphenoxy)propanoic acid [[7085-19-0]	

Cinco de los compuestos que se presentan en la tabla anterior, **2,4-D**, **diclorprop**, **fluroxipir**, **MCPA** y **mecoprop** son derivados del ácido acético o del ácido propiónico y presentan, a excepción del fluroxipir, un anillo fenoxi disustituido en su estructura.

Los otros dos pesticidas incluidos en este grupo, **fluazifop** y **haloxifop**, son éteres del ácido propanoico. Ambos presentan en su estructura un eter bicíclico y difieren entre sí en un átomo de Cl presente en el haloxifop.

Tabla VI.E.2. Propiedades de los herbicidas ácidos estudiados [1, 2].

Compuesto	Solubilidad en agua (mg L ⁻¹ , 20°C)	log K _{ow}	PKa	presión de vapor mPa (25°C)	K _{oc} (ml g ⁻¹)	log K _{oc}
2,4-D	23180	-0,83	2,87	0,0187	56	1,75
Diclorprop	350	2,29	3	0,01	170	2,23
Fluazifop	40,5	3,18	3,12	-	8	0,90
Fluroxipir	6500	2,00	2,94	0,000004	66	1,82
Haloxifop	1,6	1,34	2,9	0,00133	75	1,88
MCPA	29390	-0,81	3,73	0,4	74	1,87
Mecoprop	250000	-0,19	3,11	1,6	31	1,49

Cabría esperar que los cinco compuestos que presentan esquemas estructurales comunes mostraran valores de solubilidad, K_{ow}, K_{oc} o presiones de vapor similares pero no es así. Llama la atención el bajísimo valor de solubilidad del diclorprop en comparación con el del 2,4-D, puesto que la diferencia entre ambos es únicamente el tipo de ácido del que provienen. Esta misma diferencia también se observa entre el MCPA y el mecoprop, pero la variación en los valores de solubilidad en agua no son tan acusados.

Como se puede observar en la tabla, **2,4-D**, **MCPA** y **mecoprop** presentan una gran solubilidad en agua a la vez que bajos valores de K_{ow} que confirman su alta hidrofilia. El **fluroxipir**, también es soluble en agua aunque el valor de pK_{ow} denota un carácter más lipofílico, al igual que para el resto de analitos. En cuanto a la retención en suelos, a excepción del fluazifop, todos presentan un valor de K_{ow} propio de compuestos de los que se espera una moderada retención.

Estos herbicidas tienen complejos mecanismos de acción que se parecen a los de las auxinas (hormonas de crecimiento). Afectan la división celular, activan el metabolismo del fosfato, y modifican el metabolismo del ácido nucleico, afectando también a la síntesis de proteínas..

El **2,4-D** es un herbicida sistémico que se acumula en las regiones de crecimiento de la planta e induce malformaciones debido a la interrupción de ciertas hormonas de la planta que controlan el crecimiento de la misma. Es considerado uno de los primeros herbicidas “selectivos” pues mata más a las plantas de hoja ancha, anuales y perennes. Se suele usar en post-emergencia, en cultivos de cereales, caña de azúcar, pastizales, áreas industriales y en céspedes y campos de golf. El 2,4-D también se vende mezclado con fertilizante para el

cuidado de jardines domésticos [3] En cuanto a su toxicidad, está considerado como un pesticida de clase II según la OMS

En cuanto al **MCPA** tiene una acción más suave y más duradera que la del 2,4-D, por eso en ciertas ocasiones se aconseja su utilización sobre cultivos más sensibles a la acción herbicida. En muchas ocasiones se aplican de forma conjunta para aumentar su eficacia herbicida, en el control de especies de hoja ancha anuales ya nacidas y perennes [4].

El **fluroxipir**, al igual que el haloxifop, puede usarse en tratamientos de preemergencia y post emergencia sobre un amplio número de especies de hoja ancha. Ambos son herbicidas de traslocación que son absorbidos rápidamente por las hojas.

El **fluroxipir** en el suelo se degrada en condiciones aerobias como consecuencia de la actividad microbiana, y en condiciones anaerobias la degradación es mucho más lenta [5]. Se aplica en diversos cultivos y plantaciones de maíz, olivo, prados de gramíneas o trigo. Se utiliza fuera del ámbito agrícola en caminos, cortafuegos, recintos industriales, terrenos forestales y vías férreas [5]

El **haloxifop** se usa para el control de hierbas anuales y perennes en cultivos de hortalizas, cultivos de girasol, soja o caña de azúcar, cultivos frutícolas y plantas ornamentales. Se absorbe por el follaje y las raíces, y una vez absorbido se hidroliza a haloxifop-P que se transloca en la planta inhibiendo su crecimiento. El mismo comportamiento lo presenta el **fluazifop**, que se hidroliza a fluazifop-P. Ambos se degradan rápidamente en la mayoría de los suelos. [2, 6]

El **mecoprop**, al igual que el **dicloprop**, es un herbicida hormonal, selectivo y sistémico, absorbido por vía foliar y traslocado hasta alcanzar las zonas de las raíces en las que actúa interfiriendo la división celular así como la síntesis de las proteínas. Es muy móvil en algunos suelos y puede contaminar las aguas subterráneas. Se utiliza para el control de multitud de especies en cultivos de cebada, trigo; avena, maíz; en combinación con otros productos como ioxinil, se usa sobre césped o prados de gramíneas. El **dicloprop** en tratamiento de postemergencia es eficaz contra especies de hoja ancha resistentes al 2,4-D. [7, 8].

2. AMIDAS SUSTITUIDAS

Bajo este nombre se pueden englobar una gran variedad de productos fitosanitarios de diversas familias. De entre ellos destacan las acetamidas cuya estructura sigue el siguiente esquema.

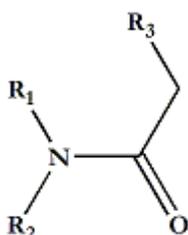


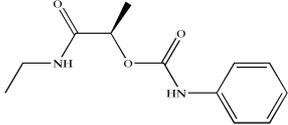
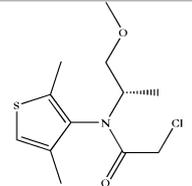
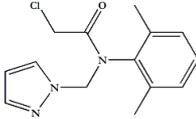
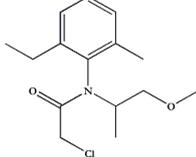
Figura VI.E.1. Estructura de la acetamida

Un caso particular lo representan las cloroacetanilidas, cuando el sustituyente R_3 es un átomo de cloro, y suponen uno de los grupos más importantes dentro de los herbicidas amida.

En esta Memoria se han estudiado 6 amidas sustituidas que se identifican a continuación, todas cloroacetanilidas a excepción de una de ellas.

Tabla VI.E.3. Identificación de las amidas estudiadas [1].

Compuesto	Formula Molecular	Nombre CAS [Número CAS]	Estructura
Acetocloro	$C_{14}H_{20}ClNO_2$	2-chloro-N-(ethoxymethyl)-N-(2-ethyl-6-methylphenyl)acetamide [34256-82-1]	
Alacloro	$C_{14}H_{20}ClNO_2$	2-chloro-N-(2,6-diethylphenyl)-N-(methoxymethyl)acetamide [15972-60-8]	

Compuesto	Formula Molecular	Nombre CAS [Número CAS]	Estructura
Carbetamida	C ₁₂ H ₁₆ N ₂ O ₃	(2R)-N-ethyl-2-[[[(phenylamino)carbonyl]oxy]propanamide [16118-49-3]	
Dimetenamida-P	C ₁₂ H ₁₈ ClNO ₂ S	2-chloro-N-(2,4-dimethyl-3-thienyl)-N-[(1S)-2-methoxy-1-methylethyl]acetamide [163515-14-8]	
Metazacloro	C ₁₄ H ₁₆ ClN ₃ O	2-chloro-N-(2,6-dimethylphenyl)-N-(1H-pyrazol-1-ylmethyl)acetamide [67129-08-2]	
Metolacloro	C ₁₅ H ₂₈ ClNO ₂	2-chloro-N-(2-ethyl-6-methylphenyl)-N-(2-methoxy-1-methylethyl)acetamide [51218-45-2]	

La **carbetamida** presenta en su estructura otro grupo funcional además de una amida. Se trata del grupo funcional característico de los **carbamatos**, ésteres derivados de los ácidos N-metilo dimetilcarbámico, sustituido con radicales alquilo o grupos aromáticos. Es por ello que este compuesto puede incluirse en ambas familias y presenta unas propiedades físico-químicas que difieren bastante del resto.

Todos ellos son pesticidas que **inhiben la síntesis de proteínas afectando al crecimiento normal de la planta**. Es por ello que se usan tanto en aplicaciones de preemergencia como de postemergencia temprana, incorporándolos al suelo desde donde se absorben por los brotes de las semillas germinadas o por vía radicular [9-11].

Tabla VI.E.4. Propiedades de las amidas estudiadas [1].

Compuesto	Solubilidad en agua (mg L ⁻¹ , 20°C)	log k _{ow}	PKa	presión de vapor mPa (25°C)	k _{oc} (ml g ⁻¹)	log k _{oc}
Acetocloro	282	4,14	-	0,02	156	2,19
Alacloro	240	3,09	0,62	2,90	124	2,09
Carbetamida	3300	1,67	11,3	0,0003	89	1,95

Compuesto	Solubilidad en agua (mg L ⁻¹ , 20°C)	log K _{ow}	PKa	presión de vapor mPa (25°C)	K _{oc} (ml g ⁻¹)	log K _{oc}
Dimetenamida-P	1450	1,89	-	2,5	139	2,14
Metazacloro	450	2,49	-	0,093	134	2,13
Metolacloro	530	3,40	-	1,70	200	2,30

Acetoclor, alacloro, metazacloro y metolacloro presentan una solubilidad en agua no muy alta, además de un valor de K_{oc} moderadamente alto, lo que indica que se lixivian poco en suelos [12]. El valor del PK_{ow} indica una cierta tendencia a la bioacumulación sobre el tejido adiposo de organismos superiores. Aplicados en suelos más arenosos o limosos, su lixiviación es mayor y llegan a los acuíferos pudiendo entrar en contacto con organismos acuáticos en donde tienden a acumularse. Se degradan fácilmente en el suelo por acción de los microorganismos y sufren fotólisis [13].

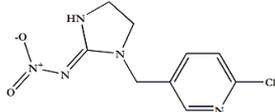
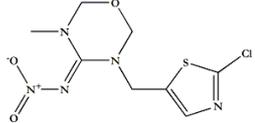
Debido a su toxicidad y presencia en el medio, el uso de alacloro, incluido en la lista de las 33 sustancias prioritarias en aguas, ha sido prohibido por la Unión Europea en el año 2006.

Por otra parte, la **carbetamida** y **dimetenamida** presentan una alta solubilidad, lo que hace que sufran lixiviación muy fácilmente, sobre todo la primera, contaminando acuíferos y especies acuáticas. Aunque su persistencia en suelos es baja, la cianacina se degrada muy fácilmente en este medio por acción de los microorganismos [14].

3. NEONICOTINOIDES

La aplicación de estos pesticidas abarca multitud de cultivos hortícolas, fructícolas y forrajeros. En 1978 Shell Chemical Co., desarrolló un compuesto basado en la nicotina, con propiedades insecticidas muy notables pero no se comercializó por ser muy inestable. La introducción de variaciones en la estructura para tratar de aumentar la estabilidad, desembocaron en el desarrollo de los denominados **nicotinoides**. El primero de ellos, el **imidacloprid**, fue introducido en el mercado en 1990 en Europa y Japón. Se distinguen neonicotinoides de primera y segunda generación, respectivamente, **cloronitilos** (con un sustituyente 6-cloro-3-piridinil) y **tianitilos** (con un sustituyente clorotiazolil) [15]. En esta Memoria se han estudiado el **imidacloprid** y **tiametoxam**.

Tabla VI.E.5. Identificación de imidacloprid y tiametoxam [1].

Compuesto	Formula Molecular	Nombre CAS [Número CAS]	Estructura
Imidacloprid	C ₉ H ₁₀ ClN ₅ O ₂	(2E)-1-[(6-chloro-3-pyridinyl)methyl]-N-nitro-2-imidazolidinimine [138261-41-3]	
Tiametoxam	C ₈ H ₁₀ ClN ₅ O ₃ S	3-[(2-chloro-5-thiazolyl)methyl]tetrahydro-5-methyl-N-nitro-4H-1,3,5-oxadiazin-4-imine [153719-23-4]	

Los neonicotinoides tienen gran poder insecticida, **actuando sobre los receptores nicotínicos de la acetilcolina**, lo que provoca un colapso en los impulsos nerviosos y conlleva la parálisis y muerte de los organismos afectados. Sin embargo presentan baja toxicidad para los mamíferos, puesto que los receptores nicotínicos en animales vertebrados son diferentes a los de insectos. Su modo de acción los hace especialmente indicados contra determinadas plagas resistentes a insecticidas convencionales [8, 16].

Tanto el imidacloprid como el tiametoxam son insecticidas de amplio espectro con elevada actividad residual, que actúan por contacto e ingestión y se usan a nivel doméstico (cebos para moscas, antiparasitarios de mascotas) y en el ámbito agropecuario contra insectos chupadores como pulgones y mosca blanca. Se usan para proteger cultivos tales como maíz, girasol, algodón, frutas, plantas de invernadero... [9]

Alguna de las propiedades que les confieren esta actividad plaguicida son:

Tabla VI.E.6. Propiedades del imidacloprid y tiametoxam [1].

Compuesto	Solubilidad en agua (mg L ⁻¹ , 20°C)	log k _{ow}	PKa	presión de vapor mPa (25°C)	k _{oc} (ml g ⁻¹)	log k _{oc}
Imidacloprid	610	0,57	-	4,0 · 10 ⁻⁰⁷	225	2,35
Tiametoxam	4100	-0,13	-	6,6 · 10 ⁻⁰⁶	70	1,70

Se trata de dos compuestos que tienen gran afinidad por las soluciones acuosas a juzgar por los bajos valores de K_{ow} y la alta solubilidad en agua. Además, las bajas presiones de vapor indican que no están presentes a nivel atmosférico. No son hidrolizables a pH fisiológico,

aunque este proceso está favorecido a pH alcalino. Resultan fácilmente biodegradables por efecto fotolítico, aunque para el imidacloprid, la degradación no está favorecida en medios aerobios. Se eliminan fácilmente en mamíferos al ser excretados por la orina y heces. [6, 8, 17]

El valor de la constante de adsorción K_{oc} , revela que el imidacloprid es bastante persistente en suelos, presentando una movilidad reducida, lo que afecta a su permanencia en este medio, aunque también hace que su presencia en aguas subterráneas no sea alta [17].

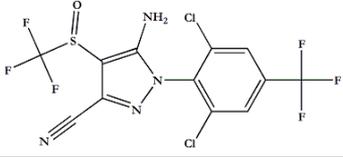
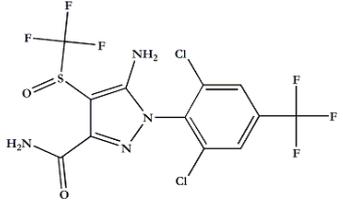
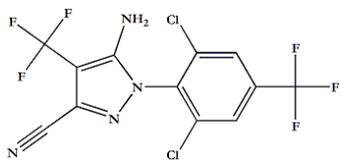
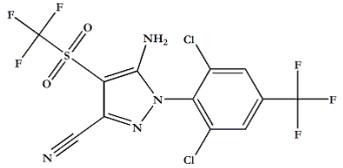
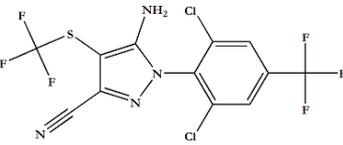
Además no desarrollan resistencia cruzada con los insecticidas organofosforados, carbamatos y piretroides, por lo que su utilización ha crecido mucho desde la década de los noventa, hasta el punto en que en los últimos años el imidacloprid es uno de los pesticidas más consumidos a nivel mundial.

Su toxicidad para humanos es moderada. No hay evidencia de que el imidacloprid tenga efectos cancerígenos, aunque el tiametoxam puede afectar a la capacidad reproductiva. [18]. Actualmente los neonicotinoides están considerados como el grupo de pesticidas menos dañino para la salud humana, dado que sus efectos tóxicos difieren mucho de los que presentan organofosforados, carbamatos o piretroides, insecticidas cuyo modo de acción resulta menos selectivo para mamíferos [19]. Ambos compuestos presentan un índice de ecotoxicidad moderado en acuíferos, aunque la mayor problemática que existe con estos compuestos, es que afectan por igual a plagas y a insectos beneficiosos [20], y se sospecha que en ciertos casos pueden ser algunas de las causas de la desaparición de insectos polinizadores, con la consecuente problemática para la agricultura, debido a la reducción de la productividad de numerosos cultivos.

4. FENILPIRAZOL

El **fipronil** es el compuesto más importante de los pertenecientes a este tipo de organonitrogenados con acción fitosanitaria. Su desarrollo como insecticida se llevó a cabo de forma paralela al de los neonicotinoides, aunque su comercialización fue algo más tardía, resultando un producto ampliamente utilizado hacia finales del siglo XX [21]. Se muestra a continuación el nombre, estructura y fórmula molecular para este compuesto y para 4 de sus metabolitos incluidos en uno de los estudios realizados en esta Tesis.

Tabla VI.E.7. Identificación del fipronil y sus metabolitos: fipronil sulfona, sulfuro, desulfinil y carboxamida [1].

Compuesto	Formula Molecular	Nombre CAS [Número CAS]	Estructura
Fipronil	$C_{12}H_4Cl_2F_6N_4OS$	5-amino-1-[2,6-dichloro-4-(trifluoromethyl)phenyl]-4-[(trifluoromethyl)sulfinyl]-1H-pyrazole-3-carbonitrile [120068-37-3]	
Fipronil carboxamida	$C_{12}H_6Cl_2F_6N_4O_2S$	5-amino-1-[2,6-dichloro-4-(trifluoromethyl)phenyl]-4-[(trifluoromethyl)sulfinyl]-1H-pyrazole-3-carbonitrile [205650-69-7]	
Fipronil desulfinil	$C_{12}H_4Cl_2F_6N_4$	5-amino-1-(2,6-dichloro-4-(trifluoromethyl)phenyl)-4-trifluoromethyl-1H-pyrazole-3-acetamide [205650-65-3]	
Fipronil sulfona	$C_{12}H_4Cl_2F_6N_4O_2S$	5-amino-1-(2,6-dichloro-a,a,a-trifluoro-p-tolyl)-4-trifluoromethylsulfonylpyrazole-3-carbonitrile [120068-36-2]	
Fipronil sulfuro	$C_{12}H_4Cl_2F_6N_4S$	5-amino-1-(2,6-dichloro-4-(trifluoromethyl)phenyl)-4-trifluoromethylthio-1H-pyrazole-3-carbonitrile [120067-83-6]	

Una de las ventajas que presenta este agroquímico frente a sus predecesores organofosforados es que el fipronil resulta muy efectivo aplicado en dosis muy bajas, controlando multitud de cultivos, empleado también en el campo de la ganadería, de uso doméstico y a nivel de higiene pública.

El fipronil es un actúa como acaricida e insecticida de amplio espectro. Al igual que los neonicotinoides, actúa por contacto y por vía digestiva, y tiene un gran poder residual. Se destina a tratamiento preventivo en presiembra aplicado a las semillas [22], y con tratamiento

preventivo y curativo en postsiembra, con absorción foliar contra insectos y en cebos contra cucarachas, termitas y pulgas. Desarrolla la actividad fitosanitaria por bloqueo de los canales de cloro regulados por el ácido γ -aminobútrico (GABA) [23-24], importante neurotransmisor tanto en los animales vertebrados como en los invertebrados, si bien el efecto en los primeros es mucho menor [9, 21].

Su utilización es muy diversa puesto que afecta a un amplio grupo de organismos. Se utiliza ampliamente para el control en cultivos de campo y plantaciones hortícolas contra larvas, cucarachas y hormigas; en los cultivos de maíz, algodón y arroz, elimina las termitas y en el ámbito doméstico y ganadero se usa para matar ácaros y garrapatas [21, 25].

Tabla VI.E.8. Propiedades del fipronil [1].

Compuesto	Solubilidad en agua (mg L ⁻¹ , 20°C)	log k_{ow}	PKa	presión de vapor mPa (25°C)	k_{oc} (ml g ⁻¹)	log k_{oc}
Fipronil	3,78	3,75	-	0,002	577	2,76

La persistencia en el terreno es moderada puesto que la fotólisis directa e indirecta, la hidrólisis (mediada por la acción de los microorganismos y en una pequeña proporción por reacciones químicas) y la volatilización, en menor medida, contribuyen a su degradación.

Presenta un bajo potencial de lixiviación (K_{oc} 3,75) por lo que no alcanza fácilmente las capas freáticas del suelo y tiende a quedarse en los 15 centímetros superiores. Se metaboliza fácilmente generando compuestos más tóxicos que se mueven rápidamente del agua al sedimento (los valores de K_{oc} para los metabolitos sulfona, sulfuro y desulfinil son del orden de 4000, 2000 y 1000 mL g⁻¹ respectivamente) [26]. Por efecto de fotólisis genera el metabolito desulfinil, tanto en agua como en suelos. Por otro lado, en suelos se produce la metabolización a firponil sulfona (metabolito mayoritario) mientras que en aguas se lleva a cabo la formación de fipronil sulfuro. En ambos medios el fipronil se metaboliza en fipronil amida que se transforma en fipronil carboxamida.

El fipronil está clasificado como peligroso para el medioambiente puesto que resulta extremadamente tóxico para organismos acuáticos e insectos, además de para aves terrestres. Es altamente tóxico para abejas y lagartijas. Alguno de sus metabolitos, en concreto sulfona, es más tóxico que el propio compuesto padre, y es por ello que el LMR para fipronil viene expresado como la suma de ambos.

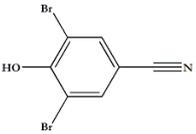
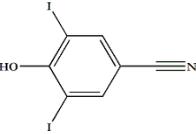
Su toxicidad aguda varía ampliamente, incluso entre animales pertenecientes a los mismos grupos, y si bien para mamíferos no presenta efectos tóxicos muy severos, resulta

altamente tóxico para algunos peces e invertebrados acuáticos además de para insectos polinizadores, aplicado aun en dosis subletales para insectos [27].

5. NITRILOS

Otro de los grupos funcionales más importante a nivel de agroquímicos pertenecientes a los compuestos de nitrógeno es el grupo nitrilo, en especial los derivados bencénicos. Pertenecientes a este grupo son el **ioxinil** y **bromoxinil** que difieren en su estructura en la presencia de átomos halógenos de yodo y bromo respectivamente.

Tabla VI.E.9. Datos identificativos de bromoxinil e ioxinil [1]

Compuesto	Formula Molecular	Nombre CAS [Número CAS]	Estructura
Bromoxinil	$C_7H_3Br_2NO$	3,5-dibromo-4-hydroxybenzonnitrile [1689-84-5]	
Ioxinil	$C_7H_3I_2NO$	4-hydroxy-3,5-diiodobenzonnitrile [1689-83-4]	

Ambos son plaguicidas de tipo herbicida utilizados en postemergencia para el control de malezas anuales en cereales, maíz, leguminosas y cultivos hortícolas. Actúan tanto por contacto directo como por vía sistémica, translocándose de forma limitada a través de las hojas y raíces de las plantas tratadas, en donde inhiben la fotosíntesis [28].

El efecto electronegativo de los halógenos les confiere propiedades distintas que marcan la persistencia en el medio, descomposición y transformaciones, de forma que, aunque la actividad plaguicida es similar, el comportamiento en el medio difiere de compuesto bromado al iodado, químicamente más estable que el primero.

Tabla VI.E.10. Propiedades físico-químicas de bromoxinil e ioxinil

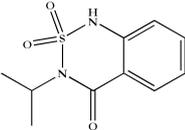
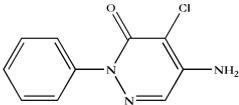
Compuesto	Solubilidad en agua (mg L ⁻¹ , 20°C)	log <i>k</i> _{ow}	PKa	presión de vapor mPa (25°C)	<i>K</i> _{oc} (ml g ⁻¹)	log <i>K</i> _{oc}
Bromoxinil	90	1,04	3,86	0,17	174	2,24
Ioxinil	3034	2,2	4,1	0,00204	276	2,44

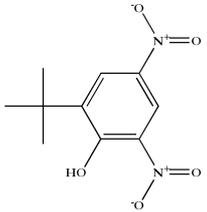
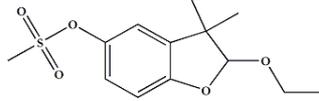
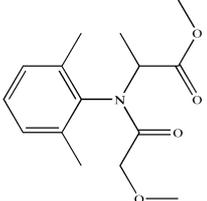
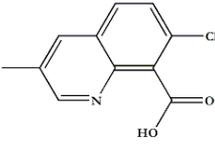
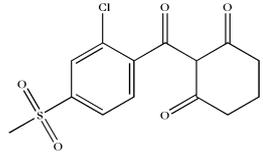
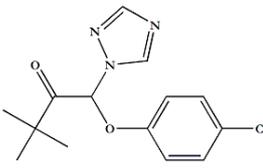
Este tipo de compuestos se degradan fácilmente en sedimentos y suelos por la transformación de los benzonitrilos en ácidos benzoicos [29]. El bromoxinil se degrada antes en suelos arenosos por acción de microorganismos, aunque se cree que puede inhibir la acción de ciertas bacterias que producen la nitrificación del grupo funcional por reducción del grupo ciano. El bromoxinil tiene baja presencia en la atmósfera en donde se degrada rápidamente por fotólisis [28]. Estudios de toxicidad han puesto de manifiesto que el ioxinil puede tener efectos en el crecimiento y desarrollo de bebés y es un potencial compuesto disruptor endocrino [30].

6. OTROS HETEROCICLOS ESTUDIADOS

Además de los compuestos presentados hasta ahora se han estudiado otros compuestos heterocíclicos, todos con al menos un átomo de nitrógeno, a excepción del etofumesato.

Tabla VI.E.11. Identificación de algunos compuestos heterocíclicos estudiados [1].

Compuesto	Formula Molecular	Nombre CAS [Número CAS]	Estructura
Bentazona	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O ₃ S	3-(1-methylethyl)-1H-2,1,3-benzothiazin-4(3H)-one 2,2-dioxide [25057-89-0]	
Cloridazón	C ₁₀ H ₈ ClN ₃ O	5-amino-4-chloro-2-phenyl-3(2H)-pyridazinone [1698-60-8]	

Compuesto	Formula Molecular	Nombre CAS [Número CAS]	Estructura
Dinoterb	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O ₅	2-(1,1-dimethylethyl)-4,6-dinitrophenol [1420-07-1]	
Etofumesato	C ₁₃ H ₁₈ O ₅ S	2-ethoxy-2,3-dihydro-3,3-dimethyl-5-benzofuranyl methanesulfonate [26225-79-6]	
Metalaxil	C ₁₅ H ₂₁ NO ₄	methyl N-(2,6-dimethylphenyl)-N-(methoxyacetyl)-DL-alaninate [57837-19-1]	
Quinmerac	C ₁₁ H ₈ ClNO ₂	7-chloro-3-methyl-8-quinolinecarboxylic acid [90717-03-6]	
Sulcotriona	C ₁₄ H ₁₃ ClO ₅ S	2-[2-chloro-4-(methylsulfonyl)benzoyl]-1,3-cyclohexanedione [99105-77-8]	
Triadimefón	C ₁₄ H ₁₆ ClN ₃ O ₂	1-(4-chlorophenoxy)-3,3-dimethyl-1-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)-2-butanone [43121-43-3]	

Se trata de ocho compuestos muy diferentes en cuanto a su naturaleza y modo de acción. Por una parte el **cloridazón**, el **etofumesato**, la **sulcotriona** y el **quinmerac** son herbicidas sistémicos y selectivos absorbidos por las raíces y hojas, mientras que la **bentazona** y el **dinoterb** no presentan comportamiento sistémico, sino más bien de contacto por lo que son mayormente de aplicación foliar. Por último, el **triadimefón** tiene acción fungicida.

El **quinmerac** afecta a nivel hormonal e interrumpe el crecimiento normal de la planta puesto que presenta una estructura química similar a la auxina IAA (fitohormona natural). Una vez transportado de las hojas o raíces a los puntos de crecimiento actúa como regulador, estimulando el crecimiento celular a dosis bajas, mientras que a dosis altas muestra efectos fitotóxicos [30, 31].

El **etofumesato** ejerce su acción herbicida por inhibición de la síntesis de lípidos en la zona foliar de la planta, limitando la formación de la cutícula cerosa, y retrasa la división celular, al igual que el **dinoterb** y la **bentazona**.

En el caso de la **sulcotriona**, la actividad herbicida se produce debido a la inhibición de la 4-hidroxifenil-piruvato-dioxigenasa que afecta a la síntesis de los pigmentos carotenoides, por lo que repercute sobre la fotosíntesis [33]

El **triadimefón** sin embargo, es un producto con actividad fungicida de acción preventiva, curativa y de erradicación. Es un pesticida sistémico de acción foliar que actúa por disrupción de las funciones de membrana de los hongos [34]. El **metalaxil** también presenta actividad antifúngica basada en el impedimento de la biosíntesis de las proteínas en los hongos sensibles, y se usa en aplicación foliar y al suelo y en tratamiento de semillas [35].

Algunas de las propiedades físico-químicas de estos compuestos son:

Tabla VI.E.12. Propiedades de algunos compuestos heterocíclicos estudiados [1].

Compuesto	Solubilidad en agua (mg L ⁻¹ , 20°C)	log k _{ow}	PKa	presión de vapor mPa (25°C)	k _{oc} (ml g ⁻¹)	log k _{oc}
Bentazona	570	-0,46	3,28	0,17	51	1,71
Cloridazón	422	1,19	3,38	0,000001	199	2,30
Dinoterb	4,5	1,91	-	20,00	42	1,62
Etofumesato	50	2,70	-	0,65	147	2,17
Metalaxil	7100	1,65	0	0,75	500	2,70
Quinmerac	107000	-0,41	4,31	0,0000001	86	1,93
Sulcotriona	1670	-1,7	3,13	0,005	1,05	0,02
Triadimefón	70	3,18	-	0,02	300	2,48

La **bentazona** presenta bastante afinidad por la fase acuosa a juzgar por la alta solubilidad y el moderado valor de K_{oc}, y tiene, al igual que el **dinoterb** y la **sulcotriona**, una gran movilidad en suelo. Estudios demuestran que a pesar de su afinidad por la fase acuosa, no

se acumula en el medio ambiente y es poco probable que la exposición por el consumo de alimentos sea alta [36]. Este mismo comportamiento lo presenta el **cloridazón**, pero en este caso, se ha demostrado que resulta peligroso para los organismos acuáticos vegetales, aunque aplicado en suelos con alto contenido en arcillas presenta una movilidad bastante baja (K_{oc} 199) [37].

El **quinmerac** resulta un compuesto altamente hidrolizable. De hecho, los valores de solubilidad, PK_{ow} y K_{oc} demuestran que es una sustancia con gran afinidad por las fases acuosas, que no se retiene con facilidad en suelos, en donde se degrada tras sufrir reacciones de hidroxilación y oxidación [13]. Este mismo compuesto lo presenta la **sulcotriona** que a pesar de ser hidrosoluble y altamente hidrofílica, no suele alcanzar los acuíferos debido a su fácil metabolización en el suelo por acción de los microorganismos [33]

En cuanto al **triadimefón**, sus propiedades difieren mucho con respecto al quinmerac, aunque también difiere su estructura, puesto que pertenece a la familia de los triazoles. En este aspecto, los valores listados en la tabla VI.E.12 se acercan más a los que presentan las triazinas (tabla VI.B.3), por lo que el comportamiento de ambos a nivel medioambiental será similar [34].

Estos pesticidas se usan en cultivos de cereales y hortícolas además de a nivel doméstico. El **quinmerac** es un herbicida sistémico que se absorbe por las hojas y provoca la inhibición del crecimiento de las malezas. Es por ello que se usa principalmente en aplicación de preemergencia o postemergencia temprana [13].

Un comportamiento similar lo presenta el **etofumesato**, que se absorbe por los brotes emergentes en las gramíneas y por las raíces en las dicotiledóneas, con traslocación a las hojas. Se suele aplicar a cultivos de cereales, remolacha azucarera y tabaco. Se degrada biológicamente en el suelo y es un potencial contaminante de acuíferos provocando una alta tasa de mortalidad en peces.

Por su parte, la **sulcotriona**, presenta absorción radicular o foliar cuando es aplicada en superficie. Se degrada rápidamente en el suelo por vía microbiana y no se esperan restos de ella a profundidades superiores a 20 cm. El riesgo de contaminación de acuíferos es muy pequeño, aunque está clasificada como peligrosa para el medioambiente, especial para el acuático. Puede ser aplicado en cultivos de maíz para el control de monocotiledóneas y dicotiledóneas anuales. Su aplicación no interfiere con insecticidas para el suelo ni con tratamientos de semillas ni tampoco con lambda-cihalotrin en tratamiento foliar [33].

El **cloridazón** también presenta un comportamiento sistémico y residual, de forma que aplicado al suelo y absorbido por las raíces, provoca la inhibición de la fotosíntesis a nivel foliar, protegiendo cultivos de azúcar, remolacha y cereales.

De igual forma, el **dinoterb** y la **bentazona** se aplican a cultivos de maíz, trigo, cebada, arroz y otros cereales, para regular la presencia de dicotiledóneas y monocotiledóneas (a excepción de las gramíneas) pero en este caso el modo de actuación es por contacto, inhibiendo la fotosíntesis. El dinoterb resulta peligroso para el medioambiente presentando una alta toxicidad para las especies acuáticas y también para el hombre, por todas las rutas de incorporación al organismo, por lo que se ha restringido su uso tras informes que ponen de manifiesto su peligrosidad para otros organismos no diana, para la salud y para el medioambiente [38, 39].

El **triadimefón** se usa en cultivos cereales como avena trigo, triticale o cebada, además de en cultivos hortícolas y a nivel doméstico, en la lucha contra hongos (el oidio sobre todo). Es ligeramente tóxico para peces y aves, pero no para insectos. Resulta muy estable en agua y se degrada por acción biológica en suelos y también por acción fotolítica [34].

En cuanto al **metalaxil**, se usa en cultivos de maíz, vid y ciertas frutas, además de para el tratamiento de suelos de semilleros de hortícolas. Presenta una alta solubilidad en agua pero por sus bajas dosis de aplicación y su corta vida media, no existe riesgo de percolación a capas profundas ni daños al medio ambiente [35].

7. BIBLIOGRAFÍA

- [1] <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/es/index.htm> (Consulta: 22-01-10)
- [2] <http://www.hdcchem.com/Haloxfop-P-methyl.html> (Consulta: 29-04-10)
- [3] Vademecum 2010 http://www.terralia.com/vademecum_de_productos_fitosanitarios_y_nutricionales/index.php?proceso=registro&numero=1197 (Consulta: 20-04-10)
- [4] Vademecum 2010 http://www.terralia.com/vademecum_de_productos_fitosanitarios_y_nutricionales/index.php?proceso=registro&numero=1424 (Consulta: 29-04-10)
- [5] Vademecum 2010 http://www.terralia.com/vademecum_de_productos_fitosanitarios_y_nutricionales/index.php?proceso=registro&numero=1374 (Consulta: 29-04-10)
- [6] Vademecum 2010 http://www.terralia.com/vademecum_de_productos_fitosanitarios_y_nutricionales/index.php?proceso=registro&numero=1365 (Consulta: 29-04-10)
- [7] Vademecum 2010 http://www.terralia.com/vademecum_de_productos_fitosanitarios_y_nutricionales/index.php?proceso=registro&numero=1429 (Consulta: 29-04-10)
- [8] Vademecum 2010 http://www.terralia.com/vademecum_de_productos_fitosanitarios_y_nutricionales/index.php?proceso=registro&numero=1320 (Consulta: 29-04-10)
- [9] PAN Pesticides Database – Chemicals http://www.pesticideinfo.org/Search_Chemicals.jsp (Consulta: 07-03-2010)
- [10] Aizawa, H.; Metabolic maps. Pesticides, environmentally relevant molecules, and biologically active molecules; Academic (San Diego, USA), **2001**, pp. 4-6; 77 – 79
- [11] Halmann, M.; Photodegradation of water pollutants; Ed.CRC (Florida, USA), 1996, pp. 185, 193-194, 198-200.

[12] Cruz-Guzmán, M.; La contaminación de suelos y aguas: Su prevención con nuevas sustancias naturales. Ed. Universidad de Sevilla, **2007**

[13] Roberts T.; Herd D.; “Metabolic Pathways Of Agrochemicals, Part 1: Herbicides And Plant Growth Regulators”; Royal Society of Chemistry (Gran Bretaña), **1998**, pp. 24 -128, 179-182 y 448-450

[14] Hole, S.; McClure, C.; Powles, S.; Rapid degradation of carbetamide upon repeated application to Australian soils; *Soil Biol. Biochem.*; **33**, **2001**, pp 739-745.

[15] Guillén J.; Serrano J.; *Toxicidad de los plaguicidas* en “Respuesta ante las intoxicaciones agudas por plaguicidas: Manual para el sanitario vigilancia epidemiológica”; Consejería de Salud (Junta de Andalucía), **2003**, pp 7-27

[16] Tomizawa, M.; Casida, J.; Neonicotinoid insecticide toxicology: Mechanisms of Selective Action; *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*; **45**, **2005**, pp. 247-268.

[17] Becerra, D.; Barba, L.; Gutiérrez, H.; *Factibilidad de biodegradación del insecticida imidacloprid y evaluación de su movilidad en un suelo* en “Avances en investigación y desarrollo en agua y saneamiento para el cumplimiento de las metas del milenio”; Restrepo, I; Sánchez, L.; Galvis, A.; Rojas, J.; Sanabria, I.; Editorial Universidad del Valle (Cali, Colombia); **2007**, pp. 445-453

[18] Stevens, J.; Breckenridge, C.; *Crop protection chemicals* en “Principles and methods of toxicology”; Wallace. A.; Taylor & Francis, **2007**, pp. 583-590

[19] Sheets, L.; Totowa, N.; *The neonicotinoid insecticides* en “Handbook of neurotoxicology: volume 1”; Massaro, E.; Humana (New Jersey, USA); **2002**, pp.79-88.

[20] Bonmartin, J.; Moineau, I.; Charvet, R.; Colin, M.; Bengsch, E.; *Behaviour of Imidacloprid in fields. Toxicity for honey bees* en “Environmental chemistry: green chemistry and pollutants in ecosystems”; Lichtfouse, E.; Schwarzbauer, J.; Robert, D.; Springer (Nueva York, USA); **2005**, pp 484 – 494;

[21] The Journal of Pesticide Action Network UK; Fipronil; *Pesticide News* ; **48**, **2000**, pp. 20-22 <<http://www.pan-uk.org/pestnews/Actives/fipronil.htm>> (Consulta: 03-03-10)

[22] Stevens, M.; Fox, K.; Coombes, N.; Lewin, L.; Effect of fipronil seed treatments on the germination and early growth of rice; *Pestic. Sci.*; **55**, **1999**, pp. 517-523.

- [23] Grant, D.; Bloomquist, J.; Ayad, H.; Chalmers, A.; A comparison of mammalian and insect GABA receptor chloride channels, *Pestic. Sci.*; 30, **1990**, pp. 355-356.
- [24] Cole L., Nicholson R., Casida J.; Action of phenyl-pyrazole insecticides at the GABA-gated chloride channel.; *Pestic. Biochem. Physiol.*; 46, **1993**, pp. 47-54.
- [25] Pesticide Residues in Food - 1997. Report. (FAO Plant Production and Protection Paper - 145); FAO Panel of Experts on Pesticide Residues in Food and the Environment and the WHO Core Assessment Group on Pesticide Residues; (Lion, Francia), **1998**.
- [26] Environmental fate of fipronil. <<http://www.pw.ucr.edu/textfiles/fipronil.pdf>> (Consulta: 03-03-10)
- [27] Kacimi El Hassani, A.; Effects of sublethal doses of fipronil on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*); *Pharmacol. Biochem. Behav.*; 82, **2005**, pp 30-39.
- [28] Kamrin, M.; Pesticide profiles: toxicity, environmental impact and fate; Ed. CRC (Florida, USA), **1997**, pp. 464-466.
- [29] Sokolová, R.; Hromadová, M.; Ludvík, J.; Pospíšil, L.; Giannarelli, S.; The autoprotonation in reduction mechanism of pesticide ioxynil; *Electrochim. Acta*; In Press, **2010**.
- [30] Catálogo de listas de plaguicidas que identifican aquellos asociados con impactos particularmente dañinos para la salud o el medio ambiente. PAN UK- Pesticide Action Network Europe, 3ª edición, **2009** < http://www.rapaluruaguay.org/agrotoxicos/Prensa/La_lista_de_listas.pdf > (Consulta: 29-04-10)
- [31] Vilches, F.; Perez, J.; BONUS (Quinmerac 10% WP) regulador del crecimiento para el cultivo de los cítricos. Resumen de trabajos de experimentación; *Levante Agríc.*; 335, **1996**, pp. 177-185.
- [32] Sterling, T.; Namuth, D; Hernández-Rios, I.; “Mecanismo(s) de Acción de las Auxinas y los Herbicidas Auxínicos - Parte 1” . <<http://croptechnology.unl.edu/printLesson.cgi?lessonID=1042575278>> (Consulta: 29-01-10)
- [33] Vademecum 2010 <http://www.terralia.com/vademecum_de_productos_fitosanitarios_y_nutricionales/index.php?proceso=registro&numero=1498> (Consulta: 29-04-10)

[34] Solecki, R.; *Toxicology of miscellaneous insecticides* en “Pesticide toxicology and international regulation”; Marrs, C.; Ballantyne, B.; John Wiley and Sons (Reino Unido); **2004**, pp.166-172 y 258-260.

[35] Vademecum 2010 <http://www.terralia.com/vademecum_de_productos_fitosanitarios_y_nutricionales/index.php?proceso=registro&numero=858> (Consulta: 29-04-10)

[36] Bentazone in drinking-water. Documento de referencia para la elaboración de las Guías de la OMS para la calidad del agua potable; WHO/SDE/WSH/03.04/77 Ginebra (Suiza)

[37] Cuevas, M.; Cox, L.; Calderón, M.; Hermosín, M.; Fernández, J.; Chloridazon and lenacil dissipation in a clayey soil of the Guadalquivir river marshes (southwest Spain); *Agric. Ecos. Environ.*; 124, **2008**, pp. 245-251.

[38] Inclusion of chemicals in the interim prior informed consent procedure: Review of notifications of final regulatory actions to ban or severely restrict a chemical: Dinoterb; UNEP/FAO/PIC/ICRC.3/15, (Ginebra, Suiza), **2001**.

[39] EPA, decision and emergency order suspending the registrations of all pesticide products containing dinoseb; *Fed Reg.*; 51, **1986**, pp. 36634.

ANEXO II - SEGMENTACIÓN EN EL MÉTODO CROMATOGRÁFICO (CG-MS/MS)

SEGMENTACIÓN EN EL MÉTODO CROMATOGRÁFICO (CG-MS/MS)

Se muestran en esta tabla las condiciones del método de detección utilizado en el capítulo IV.D relativo al análisis de muestras de suelos agrícolas.

* #	Compuesto	T _R (min)	MS ² / SIM	Ión precursor (m/z)	Voltaje de excitación (V)	Tiempo total de escaneo (seg)	µscans
1	DEA	13,4	SIM	172		0.44	2
	DETBA	13,7	MS ²	186	1,2		2
2	Empentrina	14,1	SIM	123		0.25	3
3	Atrazina	14,5	MS ²	200	1,2	1.07	2
	Atrazina-D5	14,4	MS ²	205	1,2		2
	Propazina	14,6	MS ²	214	1,2		2
	Simazina	14,4	MS ²	201	1,2		2
4	Terbutilazina	14,9	MS ²	214	1,2	0.38	3
5	Teflutrina	15,4	SIM	177		0.25	3
6	Acetocloro	16,4	MS ²	146	1,1	0.73	2
	Metil clorpirifós	16,4	MS ²	286	1,2		2
	Transflutrina	16,5	SIM	163			2
7	Alacloro	16,6	MS ²	160	1,1	0.52	2
	Prometrina	16,8	MS ²	184	1,1		2
8	Metil pirimifós	17,2	MS ²	290	1,2	0.54	2
	Terbutrina		MS ²	185	1,2		2
9	Clorpirifós D10	17,7	MS ²	324	1,1	0.64	1
	Clorpirifós	17,8	MS ²	314	1,1		1
	Metolacoloro	17,7	MS ²	162	1,2		1
	Triadimefón		MS ²	208	1,2		1
10	Bioaletrina	16,5	SIM	123		1.04	2
	Clorfenvinfós	19,1	MS ²	267	1,2		2
	Metazacloro	18,8	MS ²	209	1,2		2
11	Bifentrina	20,3	SIM	164		0.5	3
	λ-cihalotrina	26,3	SIM	181			3

ANEXO II - SEGMENTACIÓN EN EL MÉTODO CROMATOGRÁFICO (GC-MS7MS)

	Tetrametrina	24,9	SIM	164			3
12	Permetrina	27,4	MS ²	183	1,2	0.37	3
13	Fosalona	25,8	MS ²	182		0.37	3
14	Cifenotrina	25,6	SIM	181		0.25	3
15	Permetrina	27,4	SIM	183		0.25	3
16	Cipermetrina	28,4	SIM	181		0.25	3

*Segmentos del método cromatográfico

ANEXO III - ACRÓNIMOS

ACRÓNIMOS

2,4-D	Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético
ACh	(Acetilcholine) Acetilcolina
AChE	(Acetilcholinesterase) Acetilcolinesterasa
ACN	Acetonitrilo
AIA	Ácido- 3-Indolacético
ALS	Acetolactato Sintetasa
ANOVA	(Analysis of Variance) Análisis de varianza
AOAC	(Association of Official Analytical Chemists) Asociación oficial de Químicos Analíticos
API	(Atmospheric Pressure Ionization) Ionización a presión atmosférica
APCI	(Atmospheric Pressure Chemical Ionization) Ionización química a presión atmosférica
ASE	(Accelerated Solvent Extraction) Extracción acelerada con disolventes
CCα / CCα	Límite de decisión
CCβ / CCβ	Capacidad de detección
CCD	(Colony Collapse Disorder) Síndrome de despoblamiento de las colmenas
CEE	Comunidad Económica Europea
CGB	(Graphitized Carbon Black)
CI	(Chemical Ionization) Ionización química
CIAM	Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo
CMA	Concertación Máxima Admisible
DCM	Diclorometano
DDT	1,1'-(2,2,2-Tricloroetilideno)Bis[4-Clorobenceno]
DEA	Desetilatrastina
DETBA	Desetilterbutilastina

DIA	D eisopropil a trazina
DG-SANCO	(D irectorate G eneral for H ealth and C onsumer A ffairs) Dirección General de la Comisión Europea de Sanidad y Protección de los Consumidores
DSPE	(D ispersive S olid P hase E xtraction) Extracción en fase sólida dispersiva
DMA	D irectiva M arco sobre A gua
DMPA	(D imethylol p ropionic A cid) Ácido dimetilpropiónico
ECPA	(E uropean C ommission on P reservation and A ccess) Asociación Europea para Protección de Cultivos
EDTA	(E thylene D iamine T etra-acetic A cid) Ácido etilendiaminotetraacético
EEB	E ncefalopatía E spongiforme B ovina
EFSA	(E uropean F ood S afety A uthority) Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
EI	(E lectronic I mpact) Impacto electrónico
ESI	(E lectrospray I onization) Ionización por electrospray
FAO	(F ood and A griculture O rganization of the United Nations) Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
GC	(G as C hromatography) Cromatografía de gases
GUS	(G roundwater U biquity S core) Índice de ubicuidad en agua subterránea
GCB	(G raphitized C arbon B lack) Carbón graficitado
HABA	(γ - A minobutyric A cid) γ -ácido aminobútrico
HLB	(H idrophilic L ipophilic B alanced)
HPLC	(H igh P erformance L iquid C hromatography) Cromatografía líquida de alta resolución
IIAA	I nstituto de I vestigación y A nálisis A limentarios
INIA	I nstituto N acional de I vestigación y T ecnología A graria y A limentaria
IPPC	(I ntegrated P revention and P ollution C ontrol) Prevención y control integrados de la contaminación

ICS	(I nternacional C hemometrics S ociety) Sociedad Internacional de Quimiometría
ISO	(I nternational O rganization for S tandardization) Organización Internacional para la Estandarización
JMPR	(T he J oint F AO/ W HO M eetings on P esticide R esidues) Reunión Conjunta FAO/OMS sobre Residuos de Pesticidas
K_d	Constante de Distribución
K_{oc}	Coeficiente de Reparto normalizado respecto al contenido de carbono orgánico
K_{ow}	Coeficiente de Partición octanol-agua.
LC	(L iquid C hromatography) Cromatografía líquida
LD	(L ethal D ose) Dosis letal
LMR	L ímite M áximo de R esiduo
LLE	(L iquid- L iquid E xtraction) Extracción líquido-líquido
LOD	(L imit O f D etection) Límite de detección
LOQ	(L imit O f Q uantification) Límite de cuantificación
MA	Concentración M edia A nual
MAE	(M icrowave- A ssisted E xtraction) Extracción asistida por microondas
MCPA	(m eta- C hloro p erbenzoic acid) Ácido meta-cloro-perbenzoico
MeOH	M etanol
MO	M ateria O rgánica
MS	(M ass S pectrometry) Espectrometría de masas
MSPD	(M atrix S olid P hase D ispersion) Dispersión de matriz en fase sólida
NADP	N icotinamide- A denine D inucleotid P hosfate
NTE	(N eurotoxic E sterase) Esterasa neurotóxica
MWCNTs	(M ulti W all C arbon N anotubes) Nanotubos de paredes de carbono
NCA	N ormas de C alidad A mbiental
OC	Pesticidas o rganoclorados

OMS	O rganización M undial de la S alud
OP	(O rganophosphorus P esticides) Pesticidas organofosforados
PAN	(P esticide A ction N etwork) Red de acción en plaguicidas
PIC	(P rior I nformed C onsent) Consentimiento fundamentado previo
PFE	P ressurised F luid E xtraction) Extracción por fluidos presurizados
ppb	P artes P or B illón
PQ	P lastoquinona
PSA	(P rimary S econdary A mine) Amina primaria/secundaria
PTFE	P olitetrafluoroetileno
PTV	(P rogrammable T emperature V aporizing) Temperatura de vaporización programable
QED	(Q uantitation- E nhanced D ata- D ependent)
QuEChERS	(Q uick, E asy, C heap, E ffective, R ugged & S afe)
RER	(R eversed E nergy R amp) Rampa de energía invertida
RSD	(R elative S tandard D eviation) Desviación estándar relativa
SD	(S tandard D eviation) Desviación estándar
SFE	(S upercritical F luid E xtraction) Extracción con fluidos supercríticos
SID	(S urface I nduced D issociation) Disociación inducida en superficie
SIM	(S ingle I on M onitoring) Monitorización de un solo ión
SLE	(S olid- L iquid E xtraction) Extracción sólido-líquido
SPME	(S olid P hase M icroextraction) Microextracción en fase sólida
SPE	(S olid P hase E xtraction) Extracción en fase sólida
SRM	(S elective R eaction M onitoring) Monitorización de Reacciones Selectivas
TBA	T erbutilazina
UAE	(U ltrasonic- A ssisted E xtraction) Extracción asistida por ultrasonidos
UHT	(U ltra H igh T emperature) Ultra alta temperatura
USDA	(U nited S tates D epartment of A griculture)

ANEXO IV - PUBLICACIONES



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography A

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chroma

Dispersive solid-phase extraction followed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the multi-residue analysis of pesticides in raw bovine milk

Thierry Dagnac^{a,*}, Maria Garcia-Chao^a, Paula Pulleiro^a, Carmen Garcia-Jares^b, Maria Llompart^b^a INGACAL (Galician Institute for Food Quality)-CIAM (Agrarian and Agronomic Research Centre), Laboratory of Food/Feed Safety and Organic Contaminants, Apartado 10, E-15080 A Coruña, Spain^b Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Instituto de Investigación y Análisis Alimentario, Campus Sur, Universidad de Santiago de Compostela, E-15782 Santiago de Compostela, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 September 2008

Received in revised form 4 February 2009

Accepted 16 February 2009

Available online 21 February 2009

Keywords:

Raw milk

Pesticides

Liquid chromatography

Triple quadrupole mass spectrometry

Dispersive solid-phase extraction

ABSTRACT

A fast multi-residue method based on dispersive solid-phase extraction (DSPE) followed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry was developed for the simultaneous determination of 44 pesticides in raw bovine milk. Raw bovine milk samples did not percolate through SPE cartridges usually applied for pesticide extraction from homogenized pasteurized milk samples. Therefore, a DSPE technique was implemented and validated for the first time in this work. Graphitized non-porous carbon and C18 modified silica materials were tested both in combination with magnesium sulfate and bonded silica with ethylenediamine-N-propyl phase. The efficiency of the DSPE process was studied at several concentration levels obtaining the higher recoveries with C18 material. The method performance was also assessed and the limits of quantification reached the ng g^{-1} level, complying with the most recent maximum residue levels. The DSPE method was also shown to be suited to both the fatty and skimmed fractions issued from raw milk. Finally, the extraction method was successfully applied to the analysis of raw milk samples collected in 23 farms of dairy cattle from NW Spain (Galicia).

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Studies focussing on the assessment of pesticide exposure and on the adverse effects of pesticides on both human health and the environment are a matter of a growing scientific and public concern [1,2]. Milk-producing animals, such as cows, may accumulate residues of these pesticides through carry over processes from contaminated feed, grass and corn silage, water, top-layer soil and inhaled air. As a result, residues of some harmful pesticides can be detected in raw bovine milk samples [3–5]. To protect consumers and to promote trade, legal MRLs (maximum residue levels) have been established for residues of pesticides on products of plant and animal origin that are intended for human or animal consumption [6]. New rules applicable from September 1, 2008 set fully harmonised MRLs of pesticides in the European countries [7–9].

For the past three decades, organophosphorus pesticides (OPPs) have been the insecticides most commonly used by both profes-

sional pest control bodies and homeowners [10]. Nevertheless, the decision of the US Environmental Protection Agency (EPA) to phase out certain uses of the organophosphorus insecticides because of their potentially toxic effects to humans has led to their gradual replacement by pyrethroid insecticides. Although OPPs are less stable and persistent than organochlorinated pesticides, they can covalently link to some milk proteins and some studies report their presence in cow milk [11–13].

Other classes of herbicides such as triazines, phenylureas and chloroacetanilides are commonly spread in corn parcels where the entire crop is intended for bovine feed after silage processes. They are then likely to be present in corn silage along with their metabolites. The amended European Union legislation has just established MRLs for some of these herbicides in milk and dairy products and 25 of the 44 pesticides included in the present work have now specific MRLs between 0.01 and 0.1 mg kg^{-1} [14]. According to the Commission decision (97/747) [15,16] fixing the levels and frequencies of sampling provided by the Council Directive (96/23) for the monitoring of certain substances and residues thereof in certain animal products, bovine milk samples must be taken only from raw milk.

To achieve effective extractions of pesticides from milk samples, several sample preparation methods have been developed

* Corresponding author. Tel.: +34 981 64 79 02; fax: +34 981 67 36 56.
E-mail addresses: thierry.dagnac@xunta.es, tdagnac@netcourrier.com (T. Dagnac).

including liquid–liquid extraction (LLE), solid-phase extraction (SPE), dispersive solid-phase extraction (DSPE), matrix solid-phase dispersion (MSPD) and solid-phase microextraction (SPME) [17–19]. Different analytical methods have been developed aiming at the quantification of pesticide residues in milk, mostly based on chromatographic techniques coupled with mass spectrometry in tandem mode (GC–MS/MS and LC–MS/MS) [20–22]. Bogialli et al. have successfully applied SPE protocols followed by LC–MS/MS for the extraction of 30 pesticides in milk, but they used pasteurized homogenized milk samples [23]. Lehotay et al. proposed an evaluation of MSPD and DSPE of pesticides in fatty matrices, including milk, but it was also using homogenized milk from local markets [24]. Recently, we proposed a simple and rapid method based on direct SPME followed by gas chromatography with micro-electron-capture detection (GC– μ ECD) for the simultaneous determination of more than 30 pesticides (pyrethroids and organochlorinated among others) in raw milk [25].

In the present work, we describe a multi-residue method based on DSPE followed by LC–MS/MS, for the simultaneous determination of 44 pesticides in full-fat raw bovine milk. DSPE is a relatively new extraction method belonging to the so-called QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged and safe) methods. The efficiency of the extraction process was studied at several concentration levels obtaining quantitative recoveries. The performance of the methods was also assessed and the limits of quantification (LOQs) often reached the ppb level, complying with the most recent MRLs. Finally, the optimized extraction method was applied to the analysis of raw milk samples collected in 23 farms of dairy cattle from NW Spain (Galicia).

To our knowledge, this is the first application of a solid-phase extraction based-method for the multi-residue analysis of pesticides by LC–MS/MS in raw bovine milk.

As an additional objective, the developed method was also applied to assess the distribution of the target pesticides in the fatty and skimmed milk fractions.

2. Experimental

2.1. Reagents and materials

Pesticide standard solutions NE 7555, NE 7500 and NE 2530 containing organophosphorus compounds, triazines and ureas and chlorophenoxy acetic acids with a concentration of 10, 100 and 100 μ g mL⁻¹ of each compound in acetonitrile and methanol were purchased from LGC Promochem (Barcelona, Spain).

Acetochlor (99.2%), alachlor (99.5%), imidacloprid (98%), fipronil (98.4%) and methyl-pirimiphos (98.2) were obtained from Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany).

[²H₅]Atrazine (atrazine-d₅; 99.7% ²H) was from CIL-Cluzeau (Sainte Foy La Grande, France) and was used as surrogate for the extraction of the milk samples.

Methanol (HPLC grade), acetonitrile (HPLC grade), water (HPLC grade) and formic acid (LC/MS grade) were supplied by J.T. Baker (Deventer, The Netherlands).

Sodium sulfate (99%), magnesium sulfate (97%) and ammonium formate (LC/MS grade) were obtained from Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany).

Individual acetochlor, alachlor, imidacloprid, fipronil and methyl-pirimiphos stock solutions of 100 μ g mL⁻¹ of all standards were prepared in methanol.

Intermediate mixture solutions of 1 μ g mL⁻¹ in methanol were prepared from stock solutions and commercial pesticide standard solution. All working solutions containing the target pesticides were prepared by convenient dilutions of the intermediate solutions in methanol.

2.2. Fortification procedure prior to DSPE

As no CRM was available for the target compounds in milk, the method optimization studies were performed analysing fortified full-fat raw milk collected at CIAM from its own dairy cattle. Hundred milliliters of raw milk samples were spiked with all target compounds at two concentration levels (200 and 400 μ L of methanolic standard mixture of 1 ng μ L⁻¹) to obtain final concentrations of 2 and 4 ng mL⁻¹. The spiked samples were homogenized by agitation, and then they were kept at 4 °C for 1 h, to allow analyte–matrix interactions. After being again homogenized, 5 mL of milk were submitted to the DSPE procedure.

2.3. DSPE procedure

Graphitized non-porous carbon 120/400 (Supelclean EnviCarb) and C18 modified silica (Discovery DSC-18) materials were tested here both in combination with sodium sulfate, magnesium sulfate and polymerically bonded silica with ethylenediamine-N-propyl phase (Supelclean PSA). All materials were supplied by Supelco (Bellefonte, PA, USA).

Five milliliters of raw milk were diluted with 5 mL of an organic solvent (methanol or acetonitrile) containing 1% of formic acid and the mixture was shaken for 2 min. After centrifugation, the organic supernatant phase was recovered and dried with anhydrous sodium sulphate. Afterwards, the extract was put into contact with a dispersive mixture consisting of magnesium sulphate/DSC-18/Supelclean PSA (6/1/1 in g) or magnesium sulphate/Supelclean EnviCarb/Supelclean PSA (6/0.1/1 in g). After shaking and centrifugation, the final extract was evaporated under gentle nitrogen stream and reconstituted with 1 mL of methanol.

2.4. LC–MS/MS conditions

A Thermo Fischer (San Jose, CA, USA) instrument was used consisting of a Quantum Access triple quadrupole mass spectrometer equipped with a heated electrospray ionization (HESI) source. A Waters (Milford, MA, USA) symmetry shield column, 3 μ m, 150 \times 2.1 mm, was used at a flow rate of 200 μ L min⁻¹ and at 25 °C with an Accela HPLC pump/autosampler.

A gradient of the two following mobile phases starting at 70% (A)/30% (B) and ending at 10% (A)/90% (B) was used: the mobile Phase A was constituted of water/formic acid (0.15%)/ammonium formate (3 mM) and the mobile phase B of methanol/formic acid (0.15%)/ammonium formate (3 mM). Five microliters of milk extract sample or 10 μ L of standard solution were injected into the HPLC column.

2.5. MS parameters

The mass spectrometer and the HESI source were working with the following parameters: skimmer offset (4 V), sheath gas [35 au (arbitrary unit)], auxiliary gas (4 au) and capillary temperature (350 °C) both in positive and negative modes. In the positive mode: ion sweep cone gas (4 au), vaporizer temperature (200 °C) and spray voltage (3800 V). In the negative mode: ion sweep cone gas (0 au), vaporizer temperature (50 °C) and spray voltage (3000 V).

The target pesticides were directly introduced into the ion source and the collision energies of the MS/MS transitions were optimized for each of them. Table 1 lists the selective reaction monitoring (SRM) transitions used for the identification and quantification of all compounds. The peak width was 0.7 Da both in Q1 and in Q3 and the argon pressure in the collision cell (Q2) was set to 0.002 mbar. For the LC–MS/MS analysis, all SRM transitions were acquired in only one segment. Quantitation of pesticides was performed using external calibration.

Table 1
SRM transitions for the analysis of the target pesticides by LC-HESI-MS/MS.

Pesticides	<i>t_R</i> (min)	Ionization mode	Scan time (ms)	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion (<i>m/z</i>) used for quantitation	Collision energy (V)	Product ion (<i>m/z</i>) used for confirmation	Collision energy (V)
Acetochlor	14.0	HESI+	5	256	133	31	148	18
Alachlor	14.1	HESI+	5	270	238.1	10	162.2	22
Atrazine	12.2	HESI+	5	216	174.1	20	104.2	23
Atrazine- <i>d</i> ₅	12.2	HESI+	5	220.9	179.1	23	145	25
Bentazone	11.9	HESI–	20	239.1	197.2	19	132	30
Bromacil	12.6	HESI+	5	261	205	15	172	15
Bromoxynil	13.6	HESI–	20	274	167	45	79	35
Carbetamide	9.8	HESI+	5	237	120.2	13		
Chlorfenvinphos	14.7	HESI+	5	358.9	205	23	170	33
Chloridazon	8.0	HESI+	5	222	104	22	77.5	26
Chloroxuron	14.5	HESI+	5	291.1	218.2	22	163	20
Chlorpyrifos	17.1	HESI+	5	349.9	198	17	125.1	15
Chlortoluron	12.6	HESI+	5	213.1	182.1	15	140.2	18
Cyanazine	10.2	HESI+	5	241.1	214.1	16	120.1	24
Desethylatrazine (DEA)	8.5	HESI+	5	188.1	146.1	17	104	27
Desethylterbutylazine (DETBA)	11.3	HESI+	5	202.1	146.1	18	104.2	28
Desisopropylatrazine (DIA)	6.4	HESI+	5	174.1	132.2	14	104.2	22
Diazinon	14.9	HESI+	5	305.1	169.1	20	153	20
Dimefuron	12.5	HESI+	5	339.1	256	17	140	30
Dinoterb	16.0	HESI–	20	239.1	207	29	176	46
Diuron	13.4	HESI+	5	233	160.3	20	72	16
Ethidimuron	7.0	HESI+	5	265	208.1	19	162.1	21
Fipronil	15.0	HESI–	20	435	330	16	317	24
Imidacloprid	6.4	HESI+	5	256	209	17	175	22
Ioxynil	14.6	HESI–	20	370	215	38	127	50
Isoproturon	12.1	HESI+	5	207.2	134	22	72.4	13
Linuron	14.3	HESI+	5	249.1	182	20	160	16
Malathion	13.5	HESI+	5	331	127	14		
Metabromuron	12.6	HESI+	5	259	170	24	148	16
Metamitron	7.2	HESI+	5	203.1	175.1	16	104	21
Metazachlor	11.5	HESI+	5	278.1	210.1	12	134.2	20
Methabenzthiazuron	12.5	HESI+	5	222	165.1	18	150.1	35
Methyl-pirimiphos	15.2	HESI+	5	306.1	164.1	25	108	25
Metolachlor	14.0	HESI+	5	284.2	176.2	26	134	26
Mevinphos	7.6	HESI+	5	225	127	13	109	32
Monolinuron	12.1	HESI+	5	215	126.2	20	99	39
Phosalone	15.8	HESI+	5	367.9	182	12	138	28
Prometryn	12.2	HESI+	5	242	200.1	19	158.1	23
Propazine	13.4	HESI+	5	230	188	17	146.1	22
Quinmerac	7.6	HESI+	5	222	204	25	140	26
Simazine	10.8	HESI+	5	202.1	132.2	24	124	19
Terbutryn	12.3	HESI+	5	242	186.1	19		
Terbutylazine	13.7	HESI+	5	230	104	31	174.1	21
Triadimefon	13.6	HESI+	5	294	197	15	141	27
Triazophos	14.0	HESI+	5	314	162.1	18	119.1	35

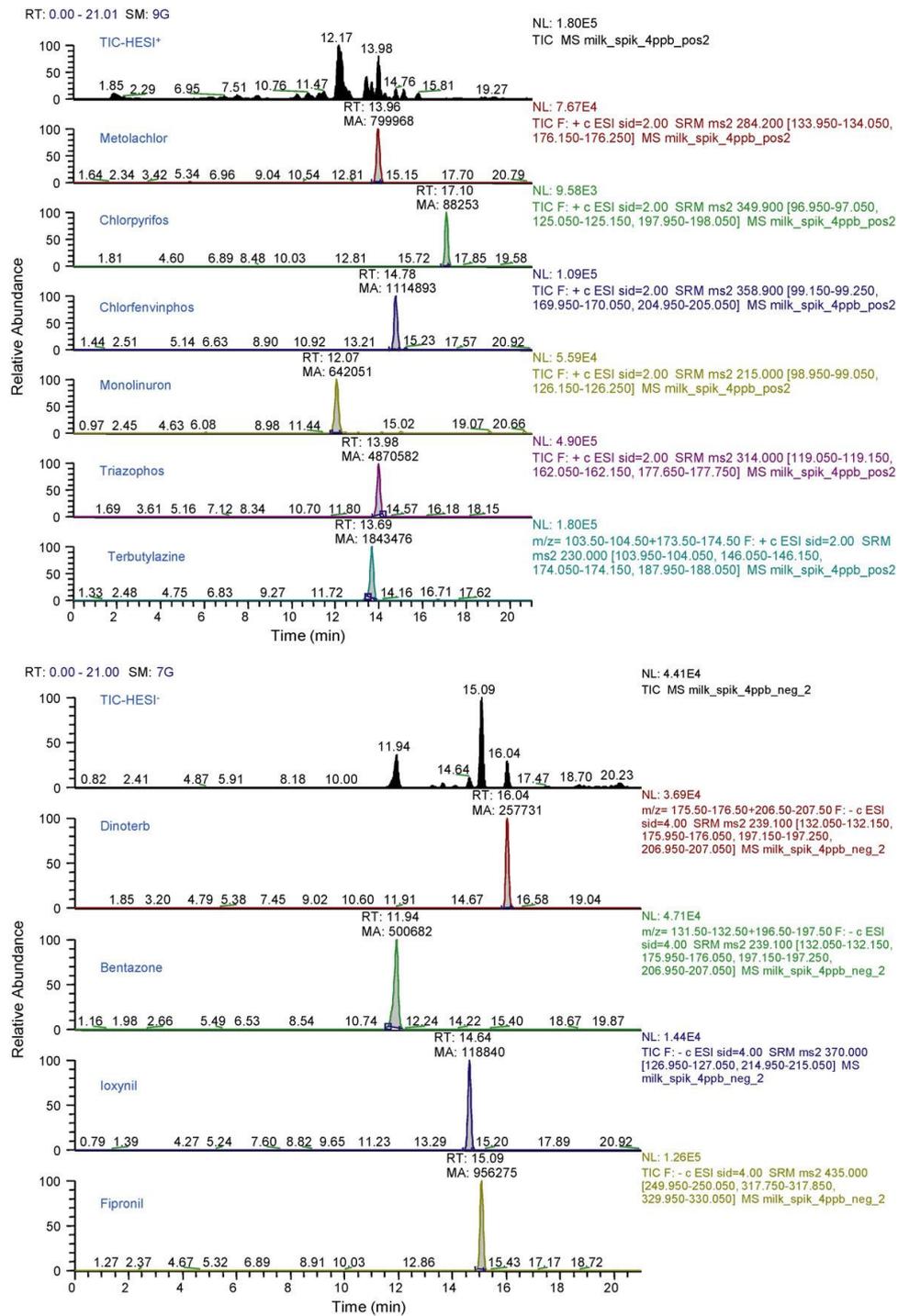


Fig. 1. LC-HESI (^{+/−}) MS/MS reconstructed chromatograms (symmetry shield column 3 μm, 150 × 2.1 mm) for a raw milk sample spiked at 4 ng mL^{−1} with all compounds and extracted with the DPSE method: examples of metolachlor, chlorpyrifos, chlorfenvinphos, monolinuron, triazophos, terbutylazine, dinoterb, bentazone, ioxynil and fipronil.

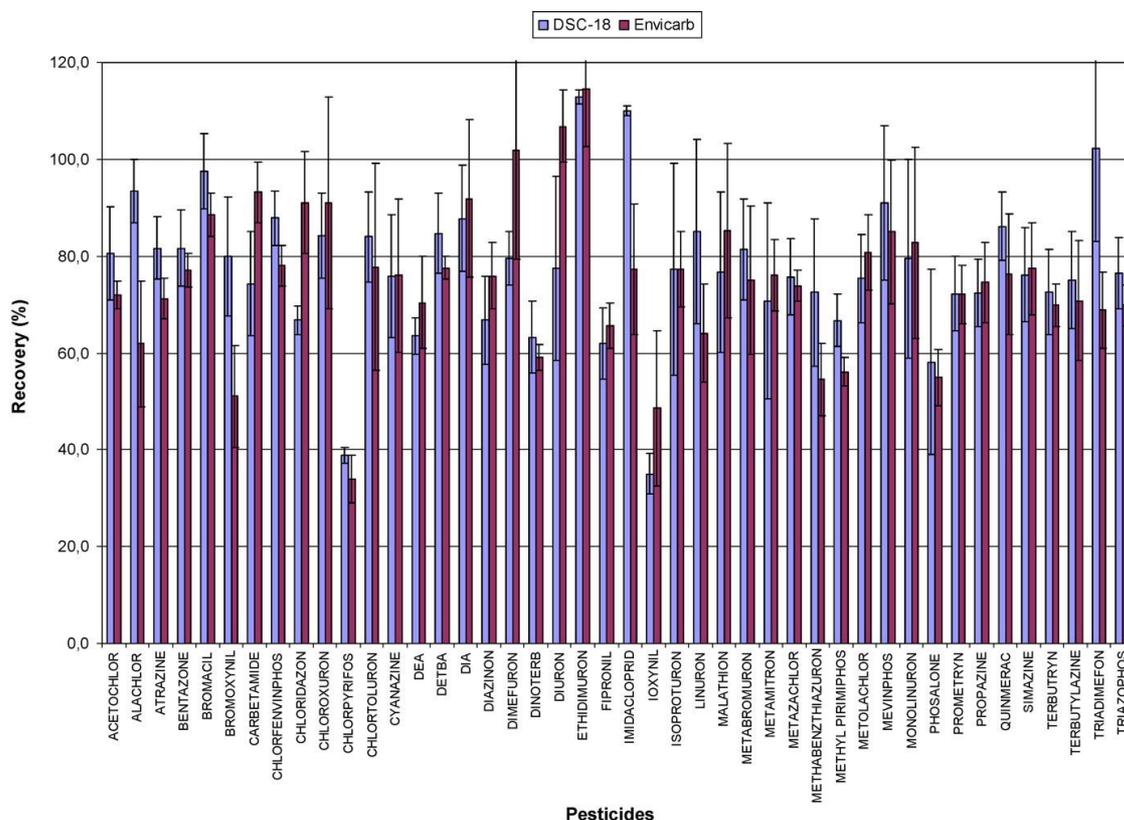


Fig. 2. Compared DSPE recoveries on DSC-18 and Envicarb materials with acetonitrile as organic solvent for a raw milk sample spiked with of all compounds at 2 ng mL^{-1} .

3. Results and discussion

The reconstructed SRM chromatograms (positive and negative modes) for some selected pesticides, corresponding to the LC-MS/MS analysis of an extract from DSPE of a raw milk sample spiked at 4 ng mL^{-1} are given in Fig. 1.

3.1. DSPE in raw milk: method development and validation

As commented in Section 1, various authors have applied SPE procedures for the extraction of pesticides and other contaminants from pasteurized homogenized milk.

The Commission decision (97/747) [16] states that the monitoring of certain substances and residues thereof in bovine milk samples must be taken only from raw milk. At the beginning of our study, we have then carried out conventional SPE with the purpose of applying it to raw milk samples. Nevertheless, we observed that these samples did not percolate through the cartridges commonly employed in the traditional SPE methods. Therefore, DSPE was implemented in this work for the determination of the 44 target pesticides in raw milk.

The choice of both the sorbent and organic solvent can be critical for the quantitative extraction of the target pesticides. Therefore, the first step of the quantitative approach consisted of testing two organic solvents, methanol and acetonitrile, with the DSPE procedure. The results obtained with DSC-18 and Envicarb materials showed that acetonitrile enabled higher pesticide responses than

methanol for both materials. Acetonitrile was then selected for the further experiments and method validation.

The DSPE recoveries of the 44 pesticides of interest were assessed in triplicate in raw milk at two concentration levels, 2 and 4 ng mL^{-1} (17.3 and 34.7 ng g^{-1}). These values were about 1.7- and 3.5-fold the lowest MRLs of the target compounds.

As can be seen in Fig. 2, the recoveries at 2 ng mL^{-1} were quantitative for most compounds with values above 70%. The relative standard deviations (RSDs) ranged from 3 to 20% with 30 compounds giving RSDs lower than 10%. At the 4 ng mL^{-1} spiking level, the recoveries range from 60 to 113% with RSD between 1 and 15%.

C18 material enabled higher recoveries than Envicarb (except for carbetamide, chloridazon, dimefuron, diuron and ioxynil) and in both cases, only chlorpyrifos, ioxynil and bromoxnyl showed recoveries lower than 50%.

In order to evaluate the precision parameters, the extract obtained from DSPE of raw milk spiked at 4 ng mL^{-1} was analyzed five times the same day (intra-day) and each day (inter-day) during one week.

The intra-day precisions were below 15% for most pesticides and the inter-day intermediate precisions (Table 2) were lower than 20% for most compounds, showing that the DSPE method was robust and offered a high repeatability degree.

Therefore, assuming that one of the main purposes of the study was to address a multi-residue method and that the recoveries and precisions achieved were satisfactory for almost all target

Table 2
Method performance achieved with the DSPE method for all target pesticides in raw bovine milk.

Pesticides	LOD (ng L ⁻¹)	LOQ (ng L ⁻¹)	LOD ^a (ng g ⁻¹)	LOQ ^a (ng g ⁻¹)	Inter-day precision (n = 5), RSD (%)	Intra-day precision (n = 5), RSD (%)	Matrix effect suppression (-)/enhancement (+) (%)	MRL (ng g ⁻¹)
Acetochlor	45	151	0.4	1.3	18.6	11.0	-23.0	10
Alachlor	54	180	0.4	2.1	13.8	11.2	-3.5	10
Atrazine	6.4	21	0.05	0.2	11.2	6.3	-25.2	
Bentazone	15	49	0.1	0.4	11.8	4.9	-3.2	20 ^b
Bromacil	106	354	0.9	2.3	18.0	8.6	-14.3	
Bromoxynil	41	138	0.3	1.2	16.9	8.0	-0.5	10 ^b
Carbetamide	71	236	0.6	2.0	10.9	16.9	-33.8	50
Chlorfenvinphos	61	202	0.5	1.7	11.9	7.4	+2.5	10
Chloridazon	70	233	0.6	2.0	12.8	20.4	-13.7	100
Chloroxuron	55	184	0.5	1.5	22.6	4.0	-4.6	50
Chlorpyrifos	78	258	0.6	2.2	21.3	19.7	-8.1	10
Chlortoluron	86	287	0.7	2.4	11.9	7.6	-17.1	50
Cyanazine	60	199	0.5	2.2	11.1	13.4	-13.9	
Desethylatrazine (DEA)	68	227	0.6	2.8	13.4	9.3	-12.7	
Desethylterbutylazine (DETBA)	58	192	0.5	1.6	20.7	16.9	-21.1	
Desisopropylatrazine (DIA)	54	181	0.5	1.5	17.1	17.0	-42.6	
Diazinon	20	66	0.2	0.6	14.6	9.7	-12.6	10
Dimetufuron	34	113	0.3	0.9	21.7	9.5	-19.8	
Dinoterb	16	53	0.1	0.4	19.0	5.2	+14	50
Diuron	199	663	1.7	5.6	13.1	6.8	-18.9	50 ^b
Ethidimuron	47	157	0.4	1.3	23.1	11.4	-22.4	
Fipronil	9.7	32	0.08	0.3	11.7	5.1	-25.6	5 ^b
Imidacloprid	60	199	0.5	1.7	18.9	16.7	-6.1	50
Ioxynil	86	285	0.7	2.4	12.8	6.3	+12.6	10 ^b
Isoproturon	97	325	0.8	2.7	11.6	7.0	-19.7	50
Linuron	143	477	1.2	1.9	15.9	10.5	-20.2	
Malathion	42	141	0.4	1.2	18.7	9.9	+13.6	20 ^b
Metabromuron	75	249	0.6	2.1	20.7	8.7	-10.8	
Metamitron	90	301	0.8	2.5	12.3	8.2	-17.4	
Metazachlor	78	259	0.6	2.2	15.9	14.6	-23.4	
Methabenzthiazuron	360	1200	3.0	10.1	10.3	4.3	-18.4	
Methyl-pirimiphos	7.5	25	0.06	0.2	9.7	6.9	-14.3	
Metolachlor	112	373	0.9	3.1	12.4	7.6	-11.9	50
Mevinphos	214	713	1.8	6.0	22.6	18.4	-3.5	
Monolinuron	101	336	0.8	2.8	12.7	8.6	-11.6	50
Phosalone	87	289	0.7	2.4	11.7	8.5	-22.3	
Prometryn	6.5	22	0.05	0.2	11.7	5.0	-19.8	
Propazine	6.4	21	0.05	0.2	7.7	5.6	-19.4	
Quinmerac	46	154	0.4	1.3	6.8	17.9	-17.2	50
Simazine	17	55	0.1	0.5	11.9	5.5	-12.9	50
Terbutryn	25	82	0.2	0.7	8.0	7.0	-13.0	
Terbutylazine	11	35	0.1	0.3	8.8	8.1	-19.1	50
Triadimefon	18	61	0.1	0.5	13.5	5.9	-9.1	100 ^b
Triazophos	20	68	0.2	0.6	8.6	3.8	-13.0	10

^a Full-fat milk density: 1.032. The non-fatty dry matter in raw milk was set to 8.5% and the fat content was set to 3.7% (average annual values from analyses of hundred of milk samples in 2006).

^b Sum of pesticide and some metabolites.

compounds, no further optimization was required for the DSPE procedure.

Following some of the main aspects of a method validation laid down in the EC Decision 2002/657 [26], the linearity of the external calibrations was checked for all compounds in the concentration range 1–20 ng mL⁻¹. Five replicates of seven mixtures of calibration standards were injected, thereby providing five calibration curves. (The 35 standard solutions were independently prepared.) According to the fitting test to the linearity model and the variance homogeneity, all calibrations were linear in the concentration range studied. These statistical treatments were performed at the confidence level (α) 1%, by means of the Fisher and Cochran tests, respectively.

A method usually employed for the appraisal of the LOQs consists of taking the concentrations obtained from the extrapolation of the signal/noise (S/N) ratios corresponding to the peak area of each compound ($S/N = 10$).

Chromatograms of DSPE extracts from samples fortified with 2–4 ng mL⁻¹ of the target pesticides were used for the LOQ assessment. For the pesticides giving very high responses (high S/N), the extract had to be diluted 5 or 10 times to reach S/N ratios not higher than 200. The final calculated LOQs (corrected with the recoveries of the proposed DSPE procedure) are given in ng L⁻¹ for milk in liquid state as well as in ng g⁻¹ to enable rigorous comparison with the MRL values. These LOQs are between 0.2 and 10 ng g⁻¹ and are well below the current legal MRLs established by the EU for 25 of the target compounds. Atrazine, bentazone, dinoterb, fipronil, methyl-pirimiphos, prometryn, propazine, simazine, terbutylazine and triadimefon can even be detected at concentrations below 0.1 ng g⁻¹.

All the parameters characterizing the method performance are detailed in Table 2.

Ion suppression/enhancement effect in the ion source was assessed by performing calibrations with matrix-matched standards (Table 2). The slope of the matrix-matched calibration

equations generally decreased, but for most compounds not more than 20% (only desisopropylatrazine (DIA) and carbetamide showed slope decrease >30%) of the slope values obtained in pure methanol extracts. That meant that the ion suppression effect was lower than 20%, and thereby it was included in the range of the method precision. Four pesticides (chlorfenvinphos, ioxynil, malathion and dinoterb) showed an enhancement effect, but lower than 15%. The different mixtures (DSC-18/Supelclean PSA or Supelclean Envi-carb/Supelclean PSA) employed for the DSPE dramatically reduced the matrix-induced signal suppression. Therefore, we have decided to use external calibration for the further experiments.

3.2. Application of the DSPE method to real milk samples

The proposed DSPE method with acetonitrile and DSC-18 material was applied to the analysis of raw bovine milk obtained from dairy farms located in NW Spain. Not any pre-treatment was carried out on these samples before implementing DSPE. No detectable residues of the target pesticides were found in any of the 35 analyzed samples. The average recovery of the surrogate atrazine-d₅ for these samples was 77.5% (RSD 8.5%). The same milk samples were analyzed by Fernandez-Alvarez et al., for the determination of pyrethroids and organochlorine compounds by SPME and GC- μ ECD-MS [25]. Neither pyrethroid nor organochlorine residues were found in any of the analyzed samples (LOQ at ng g⁻¹ level), except traces of chlordane in one sample.

3.3. Distribution of the pesticides in the milk fractions

In an attempt to find out how the target pesticides are prone to migrate in the different milk constituents, the raw milk was previously centrifuged and the previous DSPE protocol was conducted in the two resulting fractions formerly fortified (fatty and skimmed). Obviously, this protocol was not the best suited to the fatty fraction, but in most cases, the recovery precisions were below 15%,

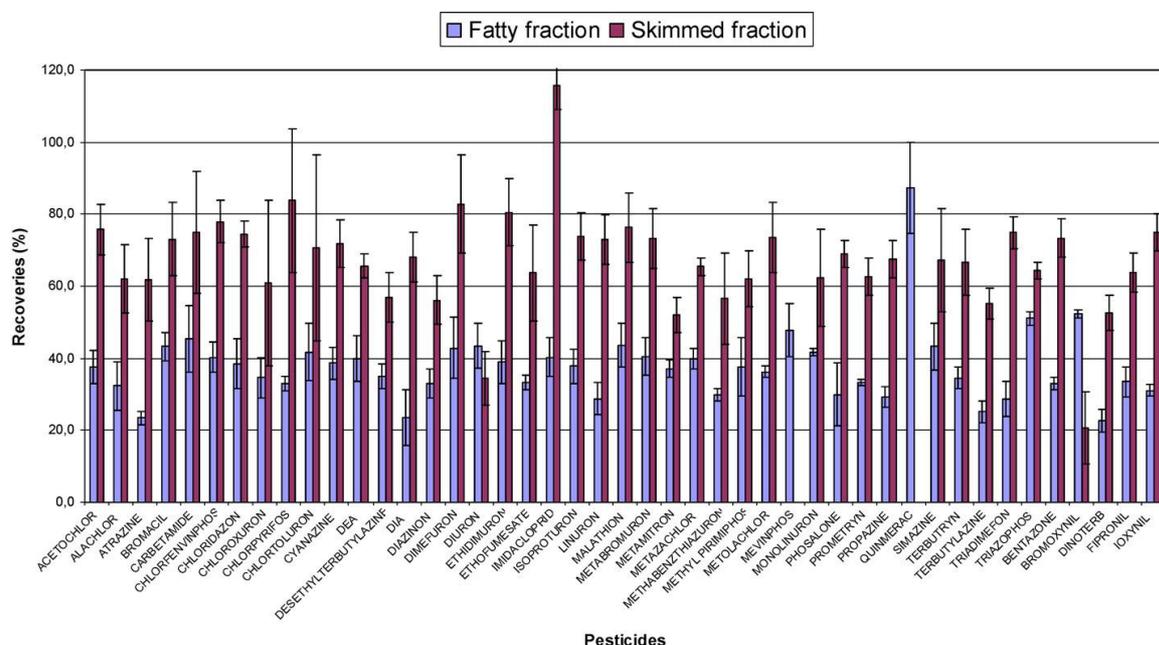


Fig. 3. Compared pesticide recoveries after DSPE on spiked fatty and skimmed fractions obtained from raw milk.

enabling the accurate quantification of the target compounds both in the skimmed and fatty fractions (Fig. 3).

The comparative ratios calculated from the amounts (in ng) of pesticides (after DSPE recovery correction) found in the fatty fraction after spiking raw milk at 2 ng mL^{-1} , underpin the high affinity of fipronil, dinoterb, organophosphorus and some triazines and chloroacetanilides for the fatty fraction. Atrazine is partially transferred to the fatty fraction and its metabolites desethylatrazine (DEA) and DIA as well as cyanazine and simazine show ratios below 50%. Phenylureas are also well distributed between the two fractions with ratios ranging from 30 to 60%. Finally, bromoxynil, bentazone, chloridazon and imidacloprid are almost totally transferred in the hydrophilic phase.

4. Conclusions

DSPE was employed to develop a new efficient, easy and rapid multi-residue method for the extraction of 44 pesticides in raw bovine milk. The use of acetonitrile along with magnesium sulphate, Supelclean PSA and DSC-18 active materials enabled the achievement of the proposed procedure and significant matrix effect was observed for only 20% of the target pesticides.

DSPE followed by LC-HESI-MS/MS provided good precision values, linear responses over the range of concentrations investigated and low limits of quantification at the ng g^{-1} level. These LOQs comply with the most recent MRLs in milk and dairy products.

Acknowledgements

This work was supported by FEDER funds and projects PGIDIT05RAG50302PR (Xunta de Galicia, Spain) M.G.C. would like to acknowledge her doctoral grant to the INIA.

References

- [1] G. Dorr, B. Noller, N. Woods, A. Hewitt, J. Hanan, S. Adkins, P.F. Ricci, Rational Environmental Management of Agrochemicals (ACS Symposium Series, No. 966), American Chemical Society, Washington, DC, 2007, p. 53.
- [2] L. Ritter, N.C.I. Goushleff, T. Arbuckle, D. Cole, M. Donald, Raizenne, J. Toxicol. Env. Health, Part B: Crit. Rev. 9 (2006) 441.
- [3] W.R. Leeman, K.J. Van Den Berg, G.F. Houben, Food Addit. Contam. 24 (2007) 1.
- [4] C.A. Kan, G.A.L. Meijer, Anim. Feed Sci. Tech. 133 (2007) 84.
- [5] K. Andrews, J. Schaum, L. Schuda, Organohalogen Compd. 60 (2003) 186.
- [6] Commission Regulation (EC) 396/2005 of the European Parliament and of the Council of 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/EEC, European Union, Brussels, 2005.
- [7] Commission Regulation (EC) No 178/2006 of 1 February 2006 amending Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council to establish Annex I listing the food and feed products to which maximum levels for pesticide residues apply, European Union, Brussels, 2006.
- [8] Commission Regulation (EC) No 149/2008 of 29 January 2008 amending Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council by establishing Annexes II, III and IV setting maximum residue levels for products covered by Annex I, European Union, Brussels, 2008.
- [9] Commission Regulation (EC) No 839/2008 of 31 July 2008 amending Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council as regards Annexes II, III and IV on maximum residue levels of pesticides in or on certain products, European Union, Brussels, 2008.
- [10] R. Jeannot, T. Dagnac, in: Nollet (Ed.), Chromatographic Analysis of the Environment (Chromatographic Science Series, vol. 93), Taylor & Francis, Boca Raton, FL, 2006, p. 841.
- [11] J.H. Salas, M.M. González, M. Noa, N.A. Pérez, G. Díaz, R. Gutiérrez, H. Zazueta, I. Osuna, J. Agric. Food Chem. 51 (2003) 4468.
- [12] Z. de, L. Cardeal, C.M. Dias Paes, J. Environ. Sci. Health B 41 (2006) 369.
- [13] G. Pagliuca, A. Serraino, T. Gazzotti, E. Zironi, A. Borsari, R. Rosmini, J. Dairy Res. 73 (2006) 340.
- [14] Pesticide EU-MRLs Database, <http://ec.europa.eu/sanco.pesticides/public/index.cfm>, European Union, Brussels, 2008.
- [15] Council Directive 96/23/EC of 29 April 1996 on measures to monitor certain substances and residues thereof in live animals and animal products, European Union, Brussels, 1996.
- [16] Commission decision of 27 October 1997 fixing the levels and frequencies of sampling provided for by Council Directive 96/23/EC for the monitoring of certain substances and residues thereof in certain animal products (Text with EEA relevance) 97/747/EC, European Union, Brussels, 1997.
- [17] M.J. González-Rodríguez, F.J. Arrebola-Liébanas, A. Garrido Frenich, J.L. Martínez Vidal, F.J. Sánchez López, Anal. Bioanal. Chem. 382 (2005) 164.
- [18] S. Bogialli, R. Curini, A. Di Corcia, A. Laganá, M. Nazarri, M. Tonci, J. Chromatogr. A 1054 (2004) 351.
- [19] S. Bogialli, A. Di Corcia, J. Biochem. Bioph. Methods 70 (2007) 163.
- [20] O. Nuñez, E. Moyano, M.T. Galceran, Trends Anal. Chem. 24 (2005) 683.
- [21] C. Soler, Y. Pico, Trends Anal. Chem. 26 (2007) 103.
- [22] D.A. Lambropoulou, T.A. Albanis, Anal. Bioanal. Chem. 389 (2007) 1663.
- [23] S. Bogialli, R. Curini, A. Di Corcia, A. Lagana, A. Stabile, E. Sturchio, J. Chromatogr. A 1102 (2006) 1.
- [24] S.J. Lehotay, K. Mastovska, S.J. Yun, C. Armendariz, J.A. Perez de Ciriza, R. Farre, J. AOAC Int. 88 (2005) 630.
- [25] M. Fernandez-Alvarez, M. Llompert, J.P. Lamas, M. Lores, C. Garcia-Jares, R. Cela, T. Dagnac, Anal. Chim. Acta 617 (2008) 37.
- [26] European Commission Decision 2002/657/EC of 14 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, Off. J. Eur. Commun. L 221 (2002) 8.



Contents lists available at ScienceDirect

Analytica Chimica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aca

Validation of an off line solid phase extraction liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the determination of systemic insecticide residues in honey and pollen samples collected in apiaries from NW Spain

María García-Chao^a, María Jesús Agruña^a, Gonzalo Flores Calvete^a, Vasilis Sakkas^b,
María Llompart^c, Thierry Dagnac^{a,*}

^a Galician Institute for Food Quality (INGACAL), Agronomic and Agrarian Research Centre (CIAM), Apartado 10, 15080 A Coruña, Spain

^b University of Ioannina, Department of Analytical Chemistry, Panepistimioupolis, 45110 Ioannina, Greece

^c University of Santiago de Compostela, Department of Analytical Chemistry, Santiago de Compostela, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 January 2010

Received in revised form 3 March 2010

Accepted 4 March 2010

Available online xxx

Keywords:

Insecticide residues

Pollen

Honey

Fipronil

Liquid chromatography–tandem mass spectrometry

Method validation

ABSTRACT

The use of pesticides to protect crops against plagues and insects is one of the most important ways to assure agricultural quality and productivity. However, bad application practices may cause the contamination of different environmental compartments and animal species, as a consequence of migration or accumulation of those compounds.

Fipronil, imidacloprid and thiametoxam are systemic or systemic-like insecticides widely used in maize crops. Their heavy action in the nervous system of target insects also means a high toxicity to non-target pollinator insects such as honey bees which can get in touch with them through pollen and nectar during foraging activities. These insecticides have even been suspected to cause a significant decrease of honeybee colonies that has been observed in many countries since the past decade.

Since September 1st 2008, the European Commission set new MRLs in food and feed of plant and animal origin. The pesticides included in this study have MRLs in honey and pollen between 10 and 50 ng g⁻¹.

In the present work, an analytical method was developed with the aim of determining residues of fipronil and some of its metabolites (fipronil sulfone, fipronil sulfide, fipronil desulfinyl and fipronil carboxamide), thiametoxam and imidacloprid in honey and pollen samples.

The extraction optimization was performed using a Doehlert experimental design by studying two factors, the mixture and the ratio of solvents used. Prior to the extraction procedure, raw hive samples containing honey, pollen and wax were centrifuged at 4000 rpm. The upper solid material was removed, and 1 g of the lower phase was mixed with 3 mL of the optimized mixture of methanol/water (10/90). The extract was passed through a florisil cartridge and the target compounds were eluted with methanol and analysed by LC–MS/MS in selective reaction monitoring (SRM) mode.

The method was validated according to the guidelines included in the SANCO/10684/2009 document and the ISO 11843 standard for the following parameters: decision limit (CC α), detection capability (CC β), recovery, repeatability and reproducibility at 0.5, 1 and 1.5 folds the MRLs. Ion suppression/enhancement effects into the ion source were also assessed.

The CC β values were included between 0.83 and 4.83 ng g⁻¹, well below the current MRLs.

The validated method was applied to the determination of the target pesticides in 91 samples collected in colonies from 73 apiaries of NW Spain (two sampling campaigns during 2008). None of the target insecticides were detected among all the collected samples.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Since decades, pesticides have been used in the agricultural field to protect crops by controlling pest and diseases they suffer, in order to assure good and high quality productions. Used as recommended, those chemicals and its residues should not have toxic effects but a bad application (dose, way to spray them, concentration, and period of application.) may cause the contamination of

* Corresponding author at: Galician Institute for Food Quality (INGACAL), Agronomic and Agrarian Research Centre (CIAM), Laboratory of Food/Feed Safety and Organic Contaminants, Apartado 10, 15080 A Coruña, Spain. Tel.: +34 981 64 79 02; fax: +34 981 67 36 56.

E-mail address: thierry.dagnac@xunta.es (T. Dagnac).

different environmental matrices such as air, water, or soils and also animal species, as a consequence of migration or accumulation of those compounds or plants that are in contact with these chemicals.

Some systemic insecticides are used as an alternative to organophosphorous and methylcarbamate compounds in several matrices as maize crops to fight against pests. One of them, fipronil, is a pyrazole insecticide suspected to have an endocrine disruption action in humans [1]; another one is imidacloprid belonging to the family of nicotinoid pesticides and which action affects the nervous system of insects causing a blockage in the nicotinergic neuronal pathway [2]. Nowadays, the use of imidacloprid is being substituted by thiamethoxam, which has the same effect, being safer for other insects as shown by the values of LD_{50} in bees for both compounds [3].

Insecticides may affect organisms different from the ones against they were spread for, being toxic to non-target insects such as honeybees. Thus, pesticides used in crops, could be liable to contaminate bees that collect nectar and pollen on flowers, which may cause the introduction of those toxic chemicals in the food chain, affecting human health [4,5].

Hives could be contaminated by direct or indirect exposure. In the first case, the product is applied directly on the hive to protect it. In the second case, the bees can get in touch with those compounds during the foraging activities in an average radius of 3–6 km around the hive [6]. Pesticide residues may provoke toxic effects on honeybees even when they are present at low doses and they have even been suspected to cause a significant decrease of honeybee colonies observed in many countries since the past decade. In this way, bee's mortality is commonly used as a tool to evaluate the level of agrochemicals in the environment [7,8].

Regulation (EC) No. 396/2005 of the European Parliament and of the Council, has established values for the maximum residue levels (MRLs) of pesticides in products of plant and animal origin. Since September 1st 2008, the European Commission set new MRLs in food and feed of plant and animal origin [9–11]; the pesticides included in this study have MRLs in honey and pollen between 10 and 50 ng g^{-1} .

According to several studies carried out in the last years, residues of those compounds and their metabolites were found in different environmental and food samples. They were also determined in commercial honey and related matrices as honeybees, pollen or wax [12–21] from which they were extracted using different techniques as LLE, ultrasonic extraction, SPE, SPME or MSPD [20,22–24]. Since this type of matrices are complex and difficult, a step of sample pre-treatment is necessary, being usual the dilution of the heated honey samples with different solvents or mixture of solvents; moreover, in order to eliminate interferences prior to analysis, clean-up procedures were applied after the extraction step [15,16,23–28]. Chromatographic techniques were the most commonly used tools to determine pesticide residues. LC–MS/MS methods have been widely developed in the last years to evaluate the presence of the target analytes in commercial honey and related samples collected during the harvest period of honey [29,30].

The Directive 96/23/EC establishes the frequencies and level of sampling for some food commodities and the Commission Decision 97/747/EC provides further rules for certain animal products like honey [31,32]. Following those rules, honey samples can be taken at any point in the production chain.

In this work we propose an analytical method based on SPE extraction working with raw samples directly taken from the apiary. In this way, the method is applied to a portion of the hive with all the components (honey, wax, pollen, larvae) with the aim to determine the presence of seven insecticides: fipronil and four of its metabolites (fipronil sulfone, fipronil sulfide, fipronil desulfinyl and fipronil carboxamide), thiamethoxam and imidacloprid. The

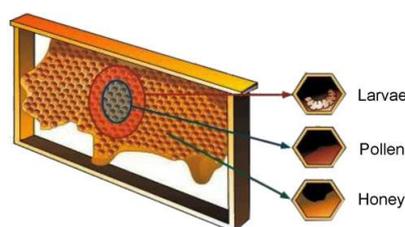


Fig. 1. Distribution of the cells in the hive.

analysis of a matrix such as honey is quite complicated because of its complex composition [27,28]. Working with raw honey is even more difficult because of the presence of different components in the same hive sample: honey, waxes, pigments and also pollen, and larvae, as shown in Fig. 1.

In a first step, the optimization of different parameters was performed using an experimental design, studying factors such as the mixture and ratio of solvents used. Pesticides were extracted from honey diluted with methanol/water using a method based on the performance of a solid phase extraction with florisol as sorbent. The compounds were eluted with methanol and analysed by LC–MS–MS working in selected reaction monitoring (SRM) mode.

The method was validated according to the guidelines included in the SANCO/10684/2009 document [33], and following the ISO 11843, studying different parameters such as linearity, recovery repeatability; reproducibility, decision limit (CC_{α}) and detection capability (CC_{β}). Finally, the developed analytical method was applied to the determination of pesticide residues in several honey samples, all collected during 2008 in two sampling campaigns from a total of 91 raw hive samples provided by the local association of beekeepers taken in 73 bee colonies around NW Spain. This study was included in a global project aiming at assessing the Colony Collapse Disorder of honey bees in Galicia (NW Spain).

2. Experimental

2.1. Chemicals

Solid standards of imidacloprid (98%), fipronil (98.4%), fipronil sulfide (99%), fipronil sulfone (99%), and standard solutions of fipronil desulfinyl (96.5%) and fipronil carboxamide (96.5%) in acetonitrile ($100 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) were purchased from Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany). Thiamethoxam (*Pestanal* quality, 98.2%) was supplied by Riedel de Haen (Sigma–Aldrich, Seelze, Germany). [$^2\text{H}_4$] Imidacloprid-D4 (99.7% 4H; Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Germany) was used as surrogate for the extraction of the samples.

Water (HPLC grade), methanol (HPLC grade) and formic acid (LC/MS grade) were supplied by J.T. Baker (Deventer, The Netherlands). Ammonium formate (LC/MS grade) was obtained from Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany).

Individual stock standard solutions of $1000 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ of the solid standards were prepared dissolving 10 mg of each compound in 10 mL of methanol. These solutions were stored at -20°C . The appropriate aliquots of individual stock solutions were diluted with methanol to prepare a mixture containing $2 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ of imidacloprid and $0.4 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ of the rest of the target analytes. All working solutions were prepared by convenient dilutions of this one. To carry out the validation of the method, standard solutions at concentrations ranging from 10 to 90 ng mL^{-1} for imidacloprid and 2 – 18 ng mL^{-1} of the other six compounds were prepared in a mixture of mobile phase (initial mobile phase composition, in order to avoid peak deformation that was observed injecting standards only prepared in methanol).

Table 1
Parameters of the mass spectrometer detector.

Common conditions	Skimmer offset (V)	Sheath gas (au ^a)	Auxiliary gas (au ^a)	Vaporizer temperature (°C)	Capillary temperature (°C)
	0	35	2	50	350
		Ion sweep cone gas (au ^a)		Spray voltage (V)	
Positive mode		2		3800	
Negative mode		0		3000	

^a Au: arbitrary units

2.2. Samples

In this study, a portion of the hive was directly treated.

2.2.1. Sample pre-treatment

In order to apply the developed method to the analysis of samples that are suspected of being contaminated, it is necessary to take a representative portion of the sample that could be easily reproducible. For this reason, and due to their heterogeneous nature, the samples received in the laboratory were treated with the aim of separating the honey fraction present in each one. For this purpose, the hive sample was placed in a falcon tube and was then centrifuged at 4000 rpm (Allegra X-22R, Beckman Coulter, Madrid, Spain). The honey portion goes to the bottom and on the top of the tube there is a mixture of waxes, pollen and larvae. This top layer was wasted and the rest, a mixture of honey with small portions of residual pollen and wax, was used to perform the extraction.

The samples treated were stored in the freezer and prior to perform the extraction procedure, they were left out for 30 min at room temperature.

2.2.2. Fortification of samples

As it is reported in the literature [12,24,25], it is necessary to heat the honey for a few minutes in order to reduce the viscosity and achieve a good and intimate mixture between the sample and the analytes in the case of spiked samples. Thus, aliquots of 1 g of centrifuged honey were heated in a bath for 10 min at a temperature range between 35 and 40 °C. Then 100 µL of a methanolic solution of target analytes was added to the sample which was then homogenized by mechanical shaking. Due to the high viscosity and the heterogeneous character of this matrix, the fortification was done individually for each sample. The fortified samples were stored for 30 min at room temperature to enable the interaction between the matrix and the compounds.

In order to carry out the validation of the proposed method, the samples were fortified to give final concentrations in the range of 25–75 ng g⁻¹ for imidacloprid and imidacloprid-D4 and 5–15 ng g⁻¹ for fipronil, fipronil carboxamide, fipronil desulfinyl, fipronil sulfide, fipronil sulfone and thiamethoxam, in accordance with the MRL values for the target analytes (if they exist) established by the Regulation (EC) No. 396/2005 of the European Parliament and of the Council.

2.3. Extraction procedure

The extraction procedure was optimized with a Doehlert design [34]. It consisted of putting one gram of heated centrifuged honey in a Falcon tube (spiked if necessary), and of diluting it with 3 mL of a solution of water:methanol. Then the mixture was mechanically shaken with a Vortex (IKA MS 3 Basic, IKA-Group, Staufen, Germany) until homogenization (30–40 s). The extraction procedure was performed with a 12 port Supelco vacuum manifold system (Supelco, Madrid, Spain). A column with a frit placed on the bottom (INTERCHIM, France) was coupled to a Florisil cartridge (Sep-Pak,

Waters Associates, Milford, MA) which was pre-conditioned with 5 mL of methanol and 5 mL of water at a flow rate lower than 3 mL min⁻¹. Then, the diluted honey sample was percolated at a flow rate of 1–2 mL min⁻¹. The Falcon tube which contained the sample was washed with 5 mL of the mixture of solvents used to dilute the honey samples. The cartridge was then washed with 5 mL of water and then with 400 µL of methanol in order to displace the rest of water that could be present in the cartridge, which was dried for 5 min. Until this moment, the eluates were discarded. Then, the compounds were eluted with 5 mL of methanol at a flow rate of 1 mL min⁻¹ and the final extract was evaporated under gentle nitrogen stream until dryness and reconstituted with 1 mL of mobile phase (corresponding to the composition of the mobile phase at the time of the sample injection). This final extract was directly analysed in the LC–MS/MS or stored at –20 °C until the analysis takes place.

2.4. Equipment

LC–MS/MS analysis was performed using a Thermo Fisher Scientific (San Jose, CA, USA) instrument consisting of an Accela HPLC pump/autosampler coupled to a Quantum Access triple quadrupole mass spectrometer equipped with a heated electrospray ionization (HESI) source working in SRM (selective reaction monitoring) mode in positive and negative ionizations.

2.4.1. LC conditions

A Waters (Milford, MA, USA) Symmetry Shield column, 3.5 µm, 150 × 2.1 mm, was used at a flow rate of 200 µL min⁻¹ and at 25 °C. The mobile phase A, consisted of water/formic acid (0.15%)/ammonium formate (3 mM), and the mobile phase B, of methanol/formic acid (0.15%)/ammonium formate (3 mM), followed a gradient program starting at 70% (A)/30% (B) and ending (14 min) at 0% (A)/100% (B).

For the sample analysis, 10 µL of standard solution or honey extract was injected into the HPLC column.

2.4.2. MS parameters

The mass spectrometer and the HESI source were working in positive mode for the determination of imidacloprid, imidacloprid-D4, and thiamethoxam; and in negative mode for the determination of fipronil and of its metabolites. The parameters of the MS detector in both cases are detailed in Table 1.

Protonated or deprotonated molecular ions were chosen as precursors of product ions. The collision energies for the MS/MS transitions were optimized by introducing directly a solution of each compound at 1 µg mL⁻¹ into the ion source. Table 2 lists the selective reaction monitoring (SRM) transitions used for the identification and quantification of the target analytes. The argon pressure in the collision cell (Q2) was set to 0.002 mbar. The peak width used was 0.7 Da both in Q1 and in Q2. The scan time was set to 10 ms for all the transitions acquired.

The LC–MS/MS analysis carried out under these conditions, enables the determination of all compounds in one single run with two segments, each of them with the proper ionization mode. The

Table 2

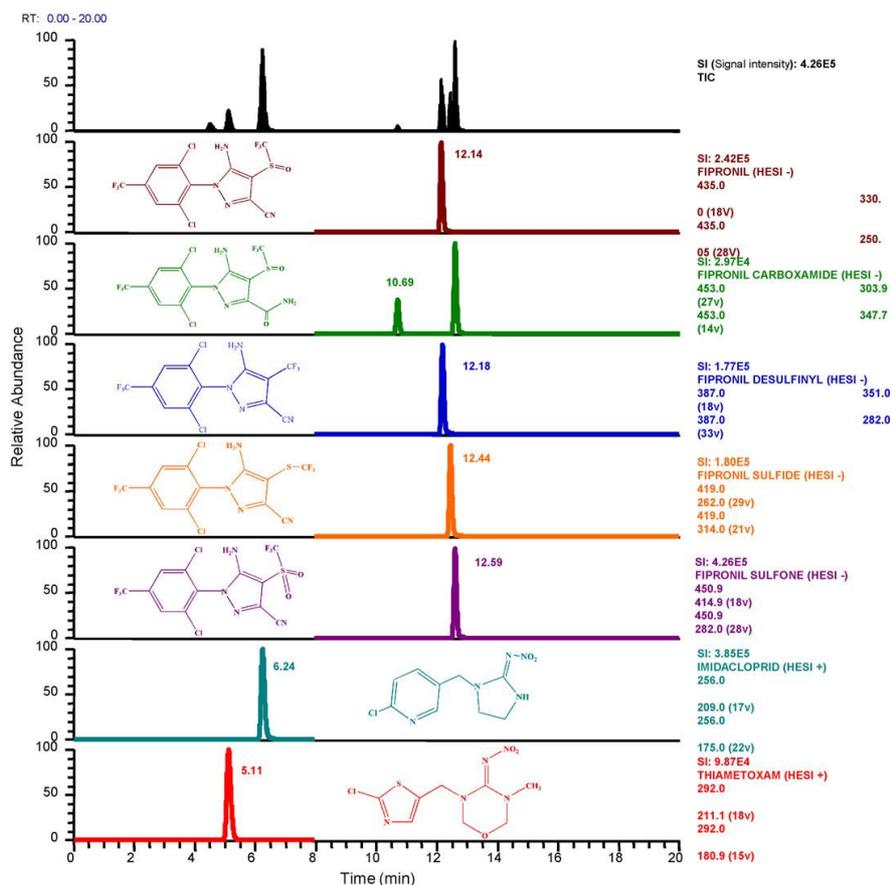
Retention time, ions monitored with the SRM mode and ionization mode for each analyte.

Pesticides	tR (min)	Ionization mode (polarity)	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z) ^a	Collision energy (V)	Product ion (m/z) ^b	Collision energy (V)
Imidacloprid	6.24	HESI(+)	256.0	209.0	17	175.0	22
Imidacloprid-D4	6.21	HESI(+)	260	179.2	21	215.9	21
Fipronil	12.14	HESI(-)	435.0	330.0	18	250.0	28
Fipronil carboxamide	10.69	HESI(-)	453.0	303.9	27	347.7	14
Fipronil desulfinyl	12.18	HESI(-)	387.0	351.0	18	282.0	33
Fipronil sulfide	12.44	HESI(-)	419.0	262.0	29	314	21
Fipronil sulfone	12.59	HESI(-)	450.9	414.9	18	282.0	28
Thiametoxam	5.11	HESI(+)	292.0	211.1	18	180.9	15

^a Used for quantitation.^b Used for confirmation.**Table 3**

Quality parameters of the optimized analytical method proposed and MRL of the target insecticides in honey.

Parameters	Fipronil	Fipronil carboxamide	Fipronil desulfinyl	Fipronil sulfide	Fipronil sulfone	Imidacloprid	Thiametoxam
CC α (ng g ⁻¹)	0.45	0.48	0.58	0.41	0.43	2.33	0.51
CC β (ng g ⁻¹)	0.89	0.96	1.16	0.83	0.85	4.63	1.00
Recovery (%)	95.7	89.9	93.2	93.4	98.8	102.4	91.3
Repeatability (%)	3.4	4.2	3.7	3.5	3.3	3.3	3.9
Within-lab reproducibility (%)	4	8	4.3	5.2	5.3	5.7	3.1
% Ion suppression/enhancement	-2	2.4	-2	-7.1	0.4	-10.4	-12
MRL (ng g ⁻¹) in honey	10 ^a				10 ^a	50	10

^a Sum fipronil + sulfone metabolite expressed as fipronil.**Fig. 2.** LC-HESI[±]-MS/MS reconstructed chromatograms (symmetry shield column 3.5 μ m, 150 \times 2.1 mm) for a raw honey sample spiked at 10 ng g⁻¹ of all compounds, except imidacloprid (50 ng g⁻¹).

Please cite this article in press as: M. García-Chao, et al., Validation of an off line solid phase extraction liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the determination of systemic insecticide residues in honey and pollen samples collected in apiaries from NW Spain, *Anal. Chim. Acta* (2010), doi:10.1016/j.aca.2010.03.011

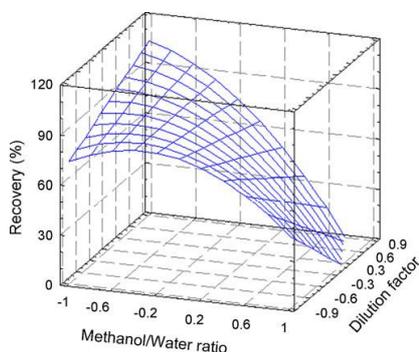


Fig. 3. Fipronil response surface obtained from the Doehlert design.

first part of the analysis is performed in positive ionization mode and the second one in negative (Fig. 2).

The pesticide quantitation was performed using external calibrations according to the results obtained from the assessment of the matrix effects (see Section 3.1).

3. Results and discussion

Focused on the method development and optimization, the effects of different parameters and their interactions were evaluated using a Doehlert experimental design [34], studying factors such as the mixture and ratio of the solvents chosen to perform the extraction. The matrix effects were also evaluated.

3.1. Evaluation of the matrix effect

The evaluation of the interactions between the matrix and the analytes was carried out by comparing the standard addition calibration curves with the external calibration curves of the standards, both prepared in methanol:water (30:70, v:v). For the addition curves, the standards were prepared directly in a blank extract of the sample, which was present in the calibration solutions at a ratio of 40%.

Assuming that no matrix effect is to be considered when the absolute difference between the slopes is lower than 15% [35], no significant effects were observed for any of the compounds studied (Table 3). The target analyte concentrations could then be estimated with external calibration curves of standards.

3.2. Doehlert experimental design

The target pesticides were extracted from honey diluted with methanol/water using a solid phase extraction method with florisil as adsorbent. In order to optimize the method, a Doehlert design with two factors, which consists of regular hexagon with six points and a central point, was performed [34]. The Doehlert matrix dimension was {5, 3}, with five levels for the first factor (methanol/water mixture composition) and three levels for the second one (honey dilution factor). The total number of experiments to be carried out was seven, plus two additional experiments at the central point.

The matrix experience and the experimental results are showed in Table 4, in which coded and real values are given for each case.

Lagrange's criterion is based on the calculation of the Hessian determinant. The coordinates of the critical (stationary) point are calculated by differencing the response function with respect to each variable.

Table 4
Experiment matrix given by the Doehlert design and experimental results.

Experiments	Methanol/water ratio		Dilution factor		Fipronil	Fipronil carboxamide	Fipronil desulfanyl	Fipronil sulfide	Fipronil sulfone	Imidacloprid	Thiametoxam
	Coded value	Real value	Coded value	Real value							
1a	0	30	0	3	71.6	59.0	71.2	71.7	65.7	77.9	55.2
1b	0	30	0	3	71.9	63.3	72.9	71.4	67.8	81.0	57.6
1c	0	30	0	3	73.5	58.6	74.5	74.3	67.6	79.7	57.2
2	-1	10	0	3	86.9	73.8	91.5	85.2	83.5	95.4	69.4
3	-0.5	20	0.866	4	92.6	75.3	94.7	93.6	87.4	98.0	70.2
4	1	50	0	3	10.7	7.4	11.9	13.0	10.9	8.1	1.0
5	0.5	40	-0.866	2	66.9	56.2	69.9	67.1	63.4	67.9	45.9
6	-0.5	20	-0.866	2	86.3	71.4	93.4	85.8	82.0	95.5	65.4
7	0.5	40	0.866	4	25.4	21.4	28.6	27.2	24.0	25.4	14.6

As depicted by the response surface for fipronil (Fig. 3), a saddle point exists within the experimental design explored. Nevertheless, an iterative procedure enables the calculation of the pseudo response maxima. The best comprise for all compounds is reached at -1 (10/90) for the methanol/water ratio and $+0.866$ (4) for the dilution factor.

The multiple regression analysis of the experimental responses gave the following results:

- All models were significant at the probability level of 99% and the correlation coefficients were all higher than 0.99.
- The squared term of the dilution factor was never significant.
- The dilution factor parameter was less influential than the methanol/water ratio factor.
- From the centre point of the methanol/water ratio, the increase of the methanol content leads to a dramatic decrease of the response.

Therefore, by setting the methanol/water ratio at 10/90 and the dilution factor at 4, the following theoretical recoveries could be reached.

Imidacloprid (109.8%), thiametoxam (81.3%), fipronil (104.1%), fipronil sulfide (103.4%), fipronil sulfone (99.5%), fipronil desulfanyl (105.5%) and fipronil carboxamide (86.1%).

3.3. Method validation

The European Decision 2002/657/EC [36] describes the validation protocol and the performance characteristics for methods related to foodstuffs control. Following this procedure, a very large amount of analytical determinations has to be performed in order to obtain the required quality parameters, meaning high solvent consumption, material and time expenses, and limitations related to the laboratory work.

Several alternative protocols were proposed aiming at minimizing the time and money invested in the validation process, satisfying the 2002/657/EC European Decision requirements. The SANCO/10684/2009 document provides the tools of choice for the quality control and quality analysis of pesticide residues in food. Therefore, for the validation of the proposed analytical method, we used both the SANCO guidelines and an alternative strategy proposed by Van Looc and Beernaert [37] based on the ISO 11843 standard (in the case of linear calibration with constant standard deviation). The parameters such as recoveries, repeatability, within-lab reproducibility, $CC\alpha$ (decision limit), $CC\beta$ (detection capability) were simultaneously determined analysing a batch of 27 samples fortified with the target analytes at concentrations of 0.5, 1 and 1.5 folds the MRL, in triplicate and at three different days.

The ISO 11843-2 provides the equations for the calculation of $CC\alpha$ and $CC\beta$ defined as the critical value of the net state variable and as the minimum detectable value of the net state variable, respectively.

For the evaluation of the decision limit ($CC\alpha$) the results (not corrected for recovery) are linear regressed ($y = a + bx$) versus the spiked concentrations. The critical value of the response variable (yc) can be calculated using this linear regression and $CC\alpha$ is directly calculated from this critical value and with the coefficients a (intercept) and b (slope). $CC\beta$ is obtained using an iterative procedure.

The repeatability and within-lab reproducibility were estimated with the analysis of variance (ANOVA) provided by the statistical treatment based on a balanced single factor design with three replicate samples on the same day for the within-lab reproducibility, and with nine replicates per spiked level for the repeatability.

With the strategy followed [37], recoveries, repeatability, within-lab reproducibility, decision limit ($CC\alpha$) and detection capability ($CC\beta$) were determined simultaneously.

3.3.1. Linearity

The linearity of the external calibrations was checked for thiametoxam, fipronil and its metabolites in the concentration range 2–18 ng mL⁻¹ and for imidacloprid in the range 10–90 ng L⁻¹. With this aim, five replicates of seven mixtures of calibration standards were independently prepared and injected providing five calibration curves. According to the fitting test to the linearity model and the variance homogeneity, the calibrations were linear in the concentration range studied for all the target analytes. These statistical treatments were performed at the confidence level (α) 1%, by means of the Fisher and Cochran tests, respectively.

3.3.2. Accuracy and within-laboratory reproducibility

These parameters were obtained from the statistical analysis of a set of results for honey samples fortified with the analytes at concentration levels of 0.5, 1 and 1.5 folds the MRL. The within-lab reproducibility was carried out on three different days. The calculated repeatability and within-lab reproducibility at each level ranged from 3.3 to 4.2% and from 3.1 to 8%, respectively, highlighting the high accuracy and robustness of the methodology proposed (Table 3).

3.3.3. Decision limit ($CC\alpha$) and detection capability ($CC\beta$)

Some of the substances we worked with had MRL values established in the Commission Regulation 839/2008/EC of 31 July 2008 [9–11] (fipronil, fipronil sulfone, imidacloprid and thiametoxam)

The results showed (Table 3) that the $CC\alpha$ values were between 0.41 and 2.33 ng g⁻¹ and the $CC\beta$ values were between 0.83 and 4.83 ng g⁻¹, fully complying with the MRL values.

3.4. Application of the validated method to real samples

The proposed validated method was applied to the analysis of raw honey/pollen samples collected in two sampling campaigns in colonies of 73 apiaries located in NW Spain. No detectable residues of the target pesticides were found in the 91 analysed samples, neither at the $CC\alpha$ levels, nor at the $CC\beta$ levels. The average recovery of the surrogate imidacloprid-D4 was 104.5% (RSD 11.3%).

4. Conclusions

This study describes the optimization and validation of a new rapid, easy, efficient and robust method based on SPE on florisil and LC-HESI-MS/MS measurements, for the determination of seven systemic insecticides (parent product and metabolites) in raw hive samples.

The method quality parameters are very satisfactory and the detection capabilities ($CC\beta$) achieved comply with the most recent MRLs in honey and pollen.

Acknowledgements

This study was included in a global project aiming at assessing the colony collapse disorder of honeybees in Galicia. It was funded by the Agricultural Ministry of the Autonomic Government of Galicia.

References

- [1] C.C. Tingle, J.A. Rother, C.F. Dewhurst, S. Lauer, W.J. King, Rev. Environ. Contam. Toxicol. 176 (2003) 1.
- [2] J. Casida, Chem. Res. Toxicol. 22 (2009) 609.
- [3] T. Iwasa, N. Motoyama, J.T. Ambrose, R.M. Roe, Crop Prot. 23 (2004) 371.
- [4] C. Porrini, A.G. Sabatini, S. Girotti, S. Ghini, P. Medrzycki, F. Grillenzoni, L. Bor-tolotti, E. Gattavecchia, G. Celli, Apiacta 38 (2003) 63.
- [5] M.E. Colin, J.M. Bonmatin, I. Moineau, C. Gaimon, S. Brun, J.P. Vermandere, Arch. Environ. Contam. Toxicol. 47 (2004) 387.
- [6] M. Beekman, W. Ratnieks, Funct. Ecol. 14 (2000) 490.

- [7] J.J.M. Bonmatin, P.A. Marchand, R. Charvet, I. Moineau, E.R. Bengsch, M.E. Colin, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 5336.
- [8] K. El-Hassani, M. Dacher, M. Gauthier, C. Armengaud, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 82 (2005) 30.
- [9] Commission Regulation (EC), pp. 396/2005 of the European Parliament, of the Council of 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food, feed of plant, animal origin, amending Council Directive 91/414/EEC, European Union, Brussels, 2005.
- [10] Commission Regulation (EC), pp. No 839/2008 of 31 July 2008 amending Regulation (EC), pp. No 396/2005 of the European Parliament, of the Council as regards Annexes II, III, IV setting maximum residue levels of pesticides in or on certain products.
- [11] <http://ec.europa.eu/sanco.pesticides/public/index.cfm>. Last accessed on October 2009.
- [12] C. Sánchez-Brunete, E. Miguel, B. Albero, J.L. Tadeo, *Span. J. Agric. Res.* 6 (2008) 7.
- [13] J.J. Jiménez, J.L. Bernal, M.J. del Nozal, M.T. Martín, R. Mayo, *J. Chromatogr. A* 1146 (2007) 8.
- [14] S. Rossi, A.G. Sabatini, R. Cenciarini, S. Ghini, S. Girotti, *Chromatographia* 61 (2005) 189.
- [15] S. Walorczyk, B. Gnusowski, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 522.
- [16] C. Pirard, J. Widart, B.K. Nguyen, C. Deleuze, L. Heudt, E. Haubruge, E. De Pauw, J.F. Focant, *J. Chromatogr. A* 1152 (2007) 116.
- [17] S. Totti, M. Fernandez, S. Ghini, Y. Pico, F. Fini, J. Manes, S. Girotti, *Talanta* 69 (2006) 724.
- [18] B. Morzycka, *J. Chromatogr. A* 982 (2002) 267.
- [19] B. Albero, C. Sanchez-Brunete, J.L. Tadeo, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 5828.
- [20] C. Blasco, M. Fernández, Y. Picó, G. Font, *J. Chromatogr. A* 1030 (2004) 77.
- [21] M. Rancan, S. Rosi, G. Sabatini, *J. Chromatogr. A* 1123 (2006) 60.
- [22] J. Zhen, L. Zhuguang, C. Meiyu, M. Yu, T. Jun, F. Yulan, W. Jiachen, C. Zhaobin, T. Fengzhang, *Chin. J. Chromatogr.* 24 (2006) 440.
- [23] D. Lambropoulou, T. Albanis, *Anal. Bioanal. Chem.* 389 (2007) 1663.
- [24] M.W. Kujawski, J. Namieśnik, *Trends Anal. Chem.* 27 (2008) 785.
- [25] J.J. Jiménez, J.L. Bernal, J. del Nozal, T. Martín, R. Mayo, *J. Chromatogr. A* 1187 (2008) 40.
- [26] R. Rial-Otero, E.M. Gaspar, I. Moura, J.L. Capelo, *Talanta* 71 (2007) 503.
- [27] A. Kadar, J. Faucon, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 9741.
- [28] S. Rissato, M.S. Galhiane, M.V. de Almeida, M. Gerenutti, B.M. Apon, *Food Chem.* 101 (2007) 1719.
- [29] C. Blasco, M. Fernandez, A. Pena, C. Lino, M.I. Silveira, G. Font, Y. Pico, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 8132.
- [30] Ö. Erdögrül, *Food Control* 18 (2007) 866.
- [31] Council Directive 96/23/EC of 29 April 1996 on measures to monitor certain substances, residues thereof in live animals, animal products, repealing Directives 85/358/EEC, 86/469/EEC, Decisions 89/187/EEC, 91/664/EEC.
- [32] Commission Decision 97/747/EC of 27 October 1997 fixing the levels, frequencies of sampling provided for by Council Directive 96/23/EC for the monitoring of certain substances, residues thereof in certain animal products.
- [33] SANCO/10684/2009 document. Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed.
- [34] S.L.C. Ferreira, W.N.L. dos Santos, C.M. Quintella, B.B. Neto, J.M. Bosque-Sendra, *Talanta* 63 (2004) 1061.
- [35] H.G. Mol, P. Plaza-Bolaños, P. Zomer, T.C. de Rijk, A.A.M. Stolker, P.P.J. Mulder, *Anal. Chem.* 80 (2008) 9450.
- [36] Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods, the interpretation of results, *Off. J. Eur. Commun. L* 221 (2002) 8–36.
- [37] J. Van Looc, H. Beernaert, *Proceedings of the Euro Food Chem XII: Strategies for Safe Food*, 2003, p. 91.

Study of the presence of priority pesticides in surface water of river basins located in two areas of intensive dairy farming in the NW Spain (Galicia).

Thierry Dagnac^{*1}, María García Chao¹, María Fernández Álvarez², Juan Castro Insua¹, María Isabel García Pomar¹ and María Llupart²

¹INGACAL (Galician Institute for Food Quality)-CIAM (Agrarian and Agronomic Research Centre), Laboratory of Food/Feed Safety and Organic Contaminants, Apartado 10, E-15080 A Coruña, Spain

²Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Bromatology, Institute of Food Research and Analysis, Campus Sur. University of Santiago de Compostela, E-15706, Santiago de Compostela, Spain

^{*} Corresponding author, thierry.dagnac@xunta.es

Abstract

The Water Framework Directive (WFD) (2000/60/EC) is designed to protect Europe's rivers and water basins. One aspect of the directive deals with the chemical pollution of surface water representing a threat to the aquatic environment and in this context a list of 33 priority substances (including 10 pesticides) has been laid down.

The new Directive on environmental quality standards (EQS) in the field of water policy (2008/105/EC) states that Member States shall ensure that the composition of their surface waters complies with environmental quality standards for priority substances, expressed as an annual average concentration (AAC) and as a maximum allowable concentration (MAC),

One package of the present study is included in a global project aiming at addressing an assessment of diffuse pollution and a first diagnostic of the quality of agricultural water and soils in Galicia (NW Spain). The first part of this study provides data about the monitoring over two years (2007-2008) of 54 target pesticides (among them 7 priority pesticides) in surface water of river catchments (order 3) located in two areas of the most intensive dairy farms of Galicia (NW Spain).

This study was carried out after conducting an exhaustive questionnaire survey in 450 dairy farms of Galicia. Apart from providing many data on the agricultural practices, the survey also revealed that atrazine (41 %), alachlor (36 %), sulcotrione (27 %) and acetochlor (17 %) were the most used herbicides in maize crops. The same survey also

showed that the most used insecticides in maize were, chlorpyrifos (30 %), cipermethrin (9 %), fenitrothion (4 %) and deltamethrin (3 %).

Solid Phase Extraction (SPE) of water samples with copolymeric divinylbenzene/N-vinylpyrrolidone cartridges followed by multi-residue analysis on a triple quadrupole mass spectrometer instrument coupled to Liquid Chromatography (LC-MS/MS) enabled to acquire the quantitative results.

At the scale of each river basin, the concentrations of the two pesticides belonging to the 33 priority substances, atrazine and alachlor, were never higher than the MAC (2 and 0.7 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively). In 2007, the sum of the concentrations of the most detected 4 compounds reached a maximum slightly higher than 1 $\mu\text{g L}^{-1}$. Their concentration profiles followed a seasonal variation, with maximum values occurring between May and June (20th), after maize seeds and herbicides have been spread in parcels.

In 2008, the highest total herbicide concentrations were not found in the same watersheds than in 2007, probably owing to the withdrawal of the active substances atrazine and alachlor which were the main compounds used by many farmers in 2007.

Since the sum of the quantified pesticides was lower than 500 ng L^{-1} , the water could have been even used for drinking water without any specific treatment over the all year.

In 2007, the sum of the AAC of these compounds was close to 300 ng L^{-1} in one watershed and between 100 and 200 ng L^{-1} in three of them, well below their allowed average values (600 and 300 ng L^{-1}). In 2008, the sum of the AAC of the same compounds was slightly higher than 100 ng L^{-1} in two watersheds.

It should be noted that the insecticides chlorfenvinphos, chlorpyrifos and fenitrothion were never detected in water at concentrations higher than 2 ng L^{-1} . The first surveys performed in agricultural top soils (0-5 cm) of the basin revealed the presence of fenitrothion, chlorpyrifos, acetochlor, alachlor, atrazine and tetramethryn at average concentrations ranging from 5 to 15 ng g^{-1} and maximum concentrations between 20 and 120 ng g^{-1} . The exhaustive monitoring of more than 300 soil samples (0-30 cm of depth, three campaigns) in twelve dairy farm parcels of the same basin is in progress (part II). These analytical data will surely bring much new information about the occurrence and fate of the most applied herbicides and insecticides in maize parcels of NW Spain.

On the basis of the very low concentrations found in surface water between August and December (both in 2007 and 2008), a subsequent leaching of pesticides from top-layer soils seems excluded.

The maximum concentrations of alachlor, acetochlor, atrazine, terbutylazine found in this study are generally lower than those detected in various European river basins.

These results suggest that a quite high livestock density in a river basin does not necessary implies a higher contamination grade of its surface water.

Aknowledgments:

This research was supported by FEDER funds and project RTA2007-00091 (INIA, Spanish Institute for Research on Agrarian and Food Technology). M.G.C. would like to acknowledge her doctoral grant to the INIA.

Simultaneous Extraction and Cleanup Method Based on Pressurized Solvent Extraction for Multiresidue Analysis of Pesticides in Complex Feed Samples

MARIA FERNANDEZ-ÁLVAREZ,[†] MARIA LLOMPART,^{*,†} J. PABLO LAMAS,[†] MARTA LORES,[†] CARMEN GARCIA-JARES,[†] MARIA GARCIA-CHAO,[‡] AND THIERRY DAGNAC[‡]

[†]Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Instituto de Investigación y Análisis Alimentario, Campus Sur, Universidad de Santiago de Compostela, E-15782 Santiago de Compostela, Spain, and [‡]INGACAL (Galician Institute for Food Quality)-CIAM (Agrarian and Agronomic Research Centre), Laboratory of Food/Feed Safety and Organic Contaminants, Apartado 10, E-15080 A Coruña, Spain

The development of a multiresidue method based on pressurized solvent extraction (PSE) to determine a large number of pesticides (mostly pyrethroids and organochlorines) in cattle feed is described. As far as we know, this is the first work dedicated to the PSE of many of the target pesticides from animal feed. A mixed level fraction design was performed to investigate the influence of several operational variables on the PSE procedure; integrated cleanup strategies were also assessed allowing the direct chromatographic analysis of the extracts. Method accuracy was evaluated by the analysis of a certified reference material (BCR-115) and different fortified cattle feed samples. Most analytes were recovered in the range of 70–110%, with relative standard deviations generally lower than 15%. Limits of detection (LODs) were below the maximum residue levels (MRLs) set by the European Union for animal feed and main crops used in the preparation of feedingstuffs. The applicability of the proposed method was demonstrated by the analysis of real cattle feed samples collected from 23 dairy farms located in Galicia (NW Spain).

KEYWORDS: Pressurized solvent extraction; feed analysis; cattle feed; pyrethroids; organochlorine pesticides; pesticides; experimental design

INTRODUCTION

The yield of agricultural and horticultural crops can be severely decreased as a result of infestation by pests and diseases. The widespread use of pesticides to control pests may result in the contamination of products intended for animal feed, which can endanger animal health or, because of their presence in livestock products, human health and the environment (1, 2). Therefore, Maximum residue levels (MRLs) have been set to protect consumers from exposure to unacceptable levels of pesticides in feedingstuffs and in main crops used for their preparation. According to the European directive 2002/32/EC on undesirable substances in animal feed, MRLs between 5 and 2000 ng g⁻¹ have been established for the most common organochlorine pesticides (2). From September 2008 onward, a new regulation that covers not only products for human food but also those intended for animal feed (3, 4) came into force in the European Union (EU). This Regulation includes pesticides used in agriculture at present or in earlier times inside or outside the EU and raises the question on how the current directive 2002/32/EC, which does not mention any modern pesticide, will be affected. The current EU and US legislations for the pesticides investigated in the

present work with respect to their residues in the most common cattle feed components (maize, barley, soya bean, and wheat) are outlined in **Table 1** (1, 3–5).

Feedingstuffs contain additional substances (especially fats) that make extraction of pesticides much more difficult than from a feed component (maize, wheat, etc.). Therefore, the analysis of pesticides in feed samples is a very difficult task, not only because of the low detection levels required by the legislations but also because of the complexity of the matrix. For these reasons, selective, sensible, and, in short, reliable analytical methods are needed. Regardless of the progress in the development of highly efficient analytical instrumentation for final determination, sample preparation remains a very important part of obtaining accurate quantitative results. Methods based on classical Soxhlet or solvent extraction have been employed in the extraction of pesticides from animal feed (6, 7). Alternatively, faster and more automated extraction techniques such as ultrasonic extraction (UE), fluidized-bed extraction (FBE), and microwave-assisted extraction (MAE) have been applied to the analysis of chlorinated pesticides in pig feed (8, 9). The QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe) method has been also used in order to prepare samples of cereal grain and some dry feedingstuffs for the determination of pesticide residues (10). In a previous paper, the authors optimized and validated a matrix solid-phase

*Corresponding author. Tel: +34 981563100. Fax: +34 981595012. E-mail: maria.llompart@usc.es.

Table 1. Current European (EU) and American (US) Legislation Regarding the Maximum Residue Levels of the Target Pesticides in the Most Common Ingredients Used in the Preparation of Cattle Feedingstuffs (4, 5)

class	pesticide	MRL (ng g ⁻¹)							
		barley		soya bean		maize		wheat	
		EU	US	EU	US	EU	US	EU	US
organochlorine	γ -lindane	10		10		10		10	
	heptachlor (sum of heptachlor and heptachlor epoxide expressed as heptachlor)	10		10		10		10	
	aldrin and dieldrin (aldrin and dieldrin combined expressed as dieldrin)	10		20		10		10	
	chlordane (sum of α - and γ -chlordane)			20					
	endosulfan (sum of isomers I, II, and endosulfan sulfate expressed as endosulfan)	50	300	500		50		50	300
	DDT (sum of <i>p,p'</i> -DDT, <i>o,p'</i> -DDT, <i>p,p'</i> -DDE and <i>p,p'</i> -TDE (DDD) expressed as DDT)	50		50		50		50	
	endrin	10		10		10		10	
	methoxychlor	10		10		10		10	
chloroacetanilide	acetochlor	10	50	10	100	100	50	10	
	alachlor	50	50	200	1000	200	200	50	50
organophosphorus	chlorpyrifos	200		50	300	50	50	50	500
	fenitroton	500 ^a		10		500 ^a		500 ^a	
pyrethroid	tefluthrin	50		50		50	60	50	
	λ -cyhalothrin	50	50	50	10	20	50	20	50
	permethrin (sum of isomers)	50		50	50	50	50	50	
	cyfluthrin (cyfluthrin including other mixtures of constituent isomers; sum of isomers)	20	150	20	30	50	50	20	150
	cypermethrin (cypermethrin including other mixtures of constituent isomers; sum of isomers)	2000		50	50 ^b	50	50 ^b	2000	200 ^b
	flucythrinate	50		50		50		50	
	fenvalerate and esfenvalerate (sum of RR and SS isomers)	200		50	50 ^c	20	20 ^c	50	
	fenvalerate and esfenvalerate (sum of RS and SR isomers)	50		50		20		20	
	deltamethrin	2000 ^d	1000	50 ^d	100	2000 ^d	1000	2000 ^d	1000

^a Temporary MRL until 1 June 2009. ^b MRL for zeta-cypermethrin. ^c MRL for fenvalerate. ^d MRL for cis-deltamethrin.

dispersion (MSPD) method for the simultaneous extraction of a high number of common pesticides and breakdown products in cattle feed (11).

Popularity of pressurized solvent extraction (PSE) has increased since its acceptance as an official US Environmental Protection Agency (EPA) method for the determination of persistent organic pollutants (POPs) in a variety of environmental solid samples (12, 13). It has been successfully applied for the extraction of pesticide residues from various matrices, such as fruits and vegetables (14), cereals (15), soya bean (16), or food (17). Nevertheless, only very few data are available in the literature about the PSE of pesticides from feedingstuffs, and they are limited to organochlorine compounds (8, 18). In PSE, pressure is applied to allow the use of liquids as extraction solvents at temperatures greater than their normal boiling point (19). Nevertheless, the extraction selectivity also decreases under these conditions because only the target analytes are solubilized. Most common postcleanup approaches for fatty samples include adsorption columns using alumina (20), silica gel (18), graphitized nonporous carbon (ENVI-Carb) (21), florisil (22), or sulfuric acid-impregnated silica gel (23), and gel-permeation chromatography (GPC) (18, 24). Frequently, more than one step is required (18). In order to avoid laborious cleanup of extracts prior to GC analysis and to increase the automation possibilities, several reports have focused on the development of in situ cleanup methods. In these cases, the elimination of lipids and other coextractable materials was achieved by adding fat retaining sorbents to the PSE cell, such as Florisil (25), alumina (26), or sulfuric acid-impregnated silica gel (23).

In the present work, a pressurized solvent extraction (PSE) cleanup procedure is proposed as a simple, rapid, and reliable alternative for the multiresidue analysis of pesticides in feedingstuffs. The complete list of pesticides comprises 36 compounds,

mostly organochlorines (including some metabolites) and pyrethroids, although several common organophosphorus and chloroacetanilides were also investigated. The effect of the solvent type and sample size on the pesticide recovery, as well as some PSE operational variables such as temperature and static time, was evaluated by means of an experimental design. Several cleanup strategies were also assessed in order to obtain suitable chromatographic extracts. Finally, the optimized extraction–cleanup methodology was validated and applied to real cattle feed samples.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. Tefluthrin, transfluthrin, allethrin (mixture of stereoisomers), tetramethrin, λ -cyhalothrin, cyphenothrin (mixture of cis and trans isomers), permethrin (mixture of cis and trans isomers), cyfluthrin (mixture of isomers), flucythrinate, fenvalerate, acetochlor, and chlorpyrifos were of Pestanal grade and were purchased from Riedel-de-Häen (Seelze, Germany). A standard mix solution containing organochlorinated pesticides and some metabolites (α -chlordane, methoxychlor, γ -chlordane, endrin ketone, endrin aldehyde, aldrin, α -lindane, β -lindane, γ -lindane, δ -lindane, *p,p'*-DDD, *p,p'*-DDE, *p,p'*-DDT, dieldrin, endosulfan I, endosulfan II, endosulfan sulfate, endrin, heptachlor, and heptachlor epoxide isomer B) with a concentration of 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of each compound in toluene/hexane (50:50), cypermethrin (mixture of isomers), and deltamethrin were supplied by Supelco (Bellefonte, PA, USA). Fenitroton andalachlor were acquired from Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany). PCB-166 and PCB-195 (employed as internal standard and surrogate, respectively) were obtained as 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ solutions in isooctane also from Dr. Ehrenstorfer.

Acetone (pesticide grade) was acquired from Prolabo (VWR, Fontenay-sous-Bois, France). *N*-Hexane (GC grade), ethyl acetate (HPLC grade), isooctane (for organic trace analysis), methanol (gradient grade), and toluene (HPLC grade) were obtained from Merck (Mollet del Vallès, Barcelona, Spain).

Sand (white quartz, 50–70 mesh, suitable for chromatography) was supplied by Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Anhydrous Na_2SO_4 was provided by Panreac (Barcelona, Spain). Neutral alumina (150 mesh), Florisil (60–100 mesh) and C18 (70–230 mesh) were achieved from Aldrich (Milwaukee, WI, USA), and silica (230–400 mesh) from Merck. Supelclean PSA SPE (primary secondary amine, solid phase extraction) bulk packing (38–35 μm) and graphitized nonporous carbon (Supelclean ENVI-Carb SPE Bulk Packing, 100–400 mesh) were obtained from Supelco. Before being used, Florisil, alumina, and silica were activated at 130 °C for 12 h and then allowed to cool down in a desiccator, while graphitized nonporous carbon was prewashed with acetone, hexane, and ethyl acetate and then thoroughly vacuum-dried and also kept in a desiccator. Alumina N, Florisil, Silica, and C18 Sep-Pak cartridges were acquired from Waters (Milford, MA, USA).

Preparation of Solutions. Individual standard stock solutions of 1,000–10,000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of pyrethroid, chloroacetanilide, and organophosphorus pesticides were prepared by accurate weighing and dissolution in the appropriate solvent (acetone, methanol, isooctane, or ethyl acetate). By dilution of stock solutions and commercial organochlorinated pesticide solution, intermediate mixture solutions of 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ in acetone were also prepared. Working solutions in acetone (to spike cattle feed samples) or ethyl acetate (to direct injection into the GC) containing the target pesticides were obtained by convenient dilutions of the intermediate solutions. Working solutions of PCB-195 in isooctane were also prepared. Stock, intermediate, and working solutions were stored in a freezer at -20 °C protected from light.

Feed Samples. The feedstuffs are very complex samples elaborated by mixing several products (more than 10 in most cases) containing a high percentage of various cereal meals, vegetal oils, oxides, and salts.

The cattle feed samples included in the present study were collected from 23 dairy farms located in NW Spain. They were ground, and the residual moisture content was calculated. Then, they were stored in their original containers at -20 °C until their analysis.

A feed sample spiked at 100 ng g^{-1} was employed for method optimization. None of the target compounds was detected in this sample. Fortification of the sample was performed by weighing 60 g in a glass vessel and pouring 12 mL of a 500 ng mL^{-1} solution of the target pesticides in acetone. Then, an extra volume of acetone (about 30 mL) was added all over the sample so that it got completely coated with organic solvent. The resulting slurry was allowed to stand (36 h at room temperature, in a switched off hood) and stirred occasionally until the acetone was completely evaporated. Then, 1 and 3 g fractions were collected and kept at -20 °C until 5–10 min before the analysis. For the analytical performance evaluation, aliquots of the same cattle feed sample spiked at concentration levels ranging from 5 to 100 ng g^{-1} were analyzed. Other feed samples were spiked at 100 ng g^{-1} for recovery studies. In addition to these samples, nonspiked feedstuffs were analyzed for the monitoring of the target pesticides.

The certified reference material (BCR-115) employed for method accuracy evaluation is an animal feed product certified for the content of 10 organochlorine pesticides: hexachlorobenzene (HCB) ($19.4 \pm 1.4 \text{ ng g}^{-1}$), β -lindane ($23 \pm 3 \text{ ng g}^{-1}$), γ -lindane ($21.8 \pm 1.9 \text{ ng g}^{-1}$), heptachlor ($19.0 \pm 1.5 \text{ ng g}^{-1}$), γ -chlordane ($48 \pm 5 \text{ ng g}^{-1}$), endosulfan I ($46 \pm 4 \text{ ng g}^{-1}$), dieldrin ($18 \pm 3 \text{ ng g}^{-1}$), endrin ($46 \pm 6 \text{ ng g}^{-1}$), *o,p'*-DDT ($46 \pm 5 \text{ ng g}^{-1}$), and *p,p'*-DDE ($47 \pm 4 \text{ ng g}^{-1}$). It was prepared by mixing different ingredients such as wheat, corn, soya bean, oil meal, tapioca, and others to mimic a mixture of pig and poultry feeds. This material was provided by the EC Community Bureau of Reference (Brussels, Belgium).

PSE and Cleanup Procedures. Extractions were performed on an ASE 200 system (Dionex, Co., Sunnyvale, CA, USA) equipped with a 24-sample carousel, 11-mL stainless steel cells, and 40-mL collection vials. To avoid the collection of suspended powders in the extraction, filters (Dionex) were placed at each end of the PSE cell. When in situ cleanup was performed, the corresponding sorbents (see Results and Discussion) were introduced into the cell, followed by the mixture of the sample (1 or 3 g) and 1 g of drying agent (anhydrous Na_2SO_4). In all experiments, 10 μL of PCB-195 surrogate solution ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) was added to each sample before extraction. Finally, the dead volume of the cell was filled up with clean sand. The packing of the extraction cell is outlined in Figure 1. The cell was tightly closed and placed into the carousel of the ASE system. Extractions were performed by preheating the cell before filling with solvent

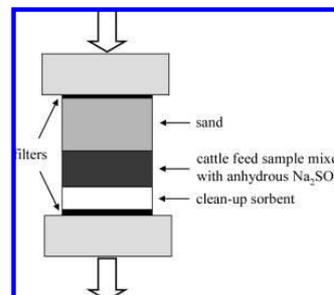


Figure 1. Packing of the extraction cell.

(preheat method). The extraction pressure was set to 1500 psi, the flush volume was 60%, and the purge time was set to 90 s. Hexane/acetone (1:1, v/v) or ethyl acetate were employed as extraction solvents, depending on the experiment. The remaining variables (extraction temperature, extraction time, and number of cycles) also varied during optimization of the method. The PSE extract (of approximately 15 mL) was concentrated to 5 mL under a nitrogen stream. At this point, a cleanup stage might be required depending on the sample (see Results and Discussion). Then, the extract was filtered through a PVDF 22 μm filter (Millex CV). One milliliter of the eluate was evaporated to dryness and rediluted in 200 μL of ethyl acetate. Finally, 1 μL of PCB-166 internal standard solution was added, and 1 μL of the final extract was injected.

For purification based on adsorption chromatography applying classical solid-phase extraction (SPE) procedures, Silica, C18 Sep-Pak, Alumina N, and Florisil cartridges were conditioned with approximately 5 mL of organic solvent. Then, the extract (5 mL) was added to the cartridge and eluted under gravity flow. In dispersive-solid-phase extraction (dSPE) experiments, an amount of 500 mg of sorbent (alumina, Florisil, a mixture of both sorbents, PSA, or silica) was weighed and mixed with the eluate (5 mL). This mixture was shaken twice for 2 min.

Chromatographic Conditions. Gas chromatographic analysis was carried out in a Hewlett-Packard 6890 GC system equipped with a ^{63}Ni microelectron capture detection, a 7683B autosampler and a split/splitless injector. Data were acquired and processed by GC Chemstation software. A 30 m \times 0.32 mm i.d. HP-5MS capillary column with a stationary phase thickness of 0.25 μm was used for the chromatographic separation of the target compounds. The GC oven temperature program was as follows: initial temperature, 80 °C (held for 2 min); increased at 15 °C min^{-1} to 200 °C; increased at 3 °C min^{-1} to 235 °C (held for 1 min); and finally increased at 20 °C min^{-1} to 300 °C and held at this temperature for 10 min, with a total acquisition program of 35.92 min. Samples were injected in the splitless mode (split opened after 2 min) at an injector temperature of 280 °C. Helium was employed as carrier gas at a constant flow rate of 1 mL min^{-1} , while nitrogen was used as makeup gas at 30 mL min^{-1} . Detector temperature was 300 °C. For confirmation of positive results, some of the real feed samples were analyzed using a Varian 3800 gas chromatograph (Varian Chromatography Systems, Walnut Creek, CA, USA) coupled to an ion trap mass detector Varian Saturn 2000 (Varian Chromatography Systems), operated in the electron impact ionization (EI) positive mode (+70 eV). The mass range was scanned in full scan mode from 80 to 500 m/z at 0.6 s scan^{-1} . The system was operated by Saturn GC/MS Workstation v5.4 software.

Statistical analysis. Basic and descriptive statistics and experimental design analysis were performed using the Statgraphics XV Centurion (Rockville, MD) software package. The experimental design was applied in the optimization of the extraction method to analyze the simultaneous effect of the main parameters affecting PSE.

RESULTS AND DISCUSSION

Optimization. Numerous parameters can potentially influence the efficiency of the pressurized solvent extraction: on the one hand, some specific PSE variables such as the temperature and pressure of the extraction, flush volume, extraction and purge time, or the number of cycles and on the other hand, as in

Table 2. Factors and Levels Considered in the Experimental Design

factor	code	low level (-)	intermediate level	high level (+)	continuous
temperature (°C)	A	80	100	120	yes
solvent	B	acetone/hexane (1:1, v/v)		ethyl acetate	no
time (min)	C	5		15	yes
sample size (g)	D	1		3	yes

conventional solid–liquid extractions, solvent nature, sample size, and cleanup stages must be also investigated.

Pressure generally has a negligible effect on the extraction yield (27), and therefore, all experiments were conducted at 1500 psi, which is the standard operating pressure in PSE extractions (28). Flush volume and purge time were set at 60% and 90 s, respectively. The influence of the remaining variables was studied as described below. Method optimization was performed on fortified cattle feed samples. Since drying of the sample is essential, in all experiments 1 g of anhydrous sodium sulfate was added to the extraction cell. Sand was employed to avoid the dead volume (see the Materials and Methods section).

In-depth cleanup of eluates prior to chromatographic analysis can be avoided (or, at least, simplified) by performing an in situ cleanup step by adding certain sorbents to the PSE cells. In this way, lipids and other coextractable materials are prevented from coming out to the extract. Experiments with and without 1 g of sorbent (Florisil) placed under the sample were performed. A deep yellow extract was indeed obtained when the cell was only filled with the sand and the mixture between the sample and the anhydrous Na₂SO₄, leading to a chromatogram with an obvious increase in the baseline and in the chromatographic artifacts compared to the one obtained when Florisil was added to the cell. Then, different sorbents (Florisil, alumina, a mixture of both sorbents, and silica) were evaluated. Silica led to the worst chromatographic profile, while the cleanest chromatograms were obtained after using alumina. The simultaneous use of Florisil and alumina did not mean any improvement with regard to alumina. Thus, in the subsequent trials, 1 g of alumina was packed in the PSE cells as the cleanup sorbent.

The use of several static cycles that introduce fresh solvent during the extraction process assists in keeping a favorable extraction equilibrium. Static cycles have proven to be useful for samples with very high analyte concentration or for samples in which the matrix hampers the solvent diffusion (28). In our case, extraction efficiency was not improved, while the background increased when two static cycles were conducted instead of one. This result is in agreement with the official pressurized fluid extraction (PFE) method 3545 (12), which recommends the use of only one static cycle as the optimal extraction conditions for semivolatiles including organochlorine pesticides and herbicides. The use of extra cycles could favor the coextraction of interfering compounds, as was observed in our case.

The optimization of the remaining variables was accomplished using an experimental design in order to detect the most influential factors and their optimum levels, evaluating also possible interactions between variables, and minimizing the number of trials needed. The studied factors were extraction temperature (A), solvent nature (B), extraction time (C), and sample size (D) (see factors and levels in Table 2).

Temperature is an important parameter that favors PSE extractions, although the use of high temperatures can reduce selectivity (29) and cause compound degradation as well, as has been described for DDT (30). This factor (A) was evaluated at three levels: 80, 100, and 120 °C. The choice of an appropriate

Table 3. Experimental Conditions of the 3·2³⁻¹ Experimental Design^a

experiment	temperature (°C)	solvent	time (min)	sample size (g)
1*	100	acetone/hexane	10	2
2	80	acetone/hexane	5	1
3	80	acetone/hexane	15	3
4	80	ethyl acetate	5	3
5	80	ethyl acetate	15	1
6	100	acetone/hexane	5	3
7	100	acetone/hexane	15	1
8	100	ethyl acetate	5	1
9	100	ethyl acetate	15	3
10	120	acetone/hexane	5	1
11	120	acetone/hexane	15	3
12	120	ethyl acetate	5	3
13	120	ethyl acetate	15	1
14*	100	ethyl acetate	10	2

^aCentral points are marked with an asterisk.

solvent (B) is another essential aspect in the development of extraction methods. For an efficient extraction, the solvent must solubilize the target analytes while leaving the sample matrix as intact as possible (28). Two solvents were investigated: acetone/hexane (1:1, v/v) and ethyl acetate. The use of mixtures of solvents of different polarities is usual when a broad range of compound classes has to be extracted, and acetone/hexane has proved to be suitable to extract pesticides from animal feed (8, 18) and other environmental matrixes (31). In other studies, ethyl acetate has been also used in the PSE extraction of several pesticides from meat and food samples (17, 24). PSE extraction times are very short compared to those required in conventional solid–liquid extraction techniques. A few minutes are often enough, although higher static times are sometimes needed to extract the analytes strongly retained in pores or other structures of certain samples (28). In the present work, extraction time (C) was assessed at 5 and 15 min. Finally, the effect of sample size (D) was evaluated at two levels: 1 and 3 g.

A 3·2³⁻¹ mixed level fraction design was proposed (Statgraphics XV Centurion). In contrast to other screening designs, this one allows running one quantitative factor (A) at 3 levels rather than 2. The resolution of the design is V, enabling an estimation of all main effects and all two-factor interactions. Two center points were added to increase the degrees of freedom to evaluate the experimental error. Thus, 14 experiments were run under the conditions specified in Table 3. In all experiments, the extraction cell was loaded with 1 g of alumina followed by the mixture of the fortified sample (at 100 ng g⁻¹) and anhydrous Na₂SO₄. Sand was also added at the top, and one cellulose filter was placed at each end of the cell. The instrumental settings were those mentioned above (60% flush volume, 90 s of purge time, 1500 psi, and one static cycle).

The outcomes of the experimental design can be simply interpreted by visualizing several intuitive software tools provided by Statgraphics. For practical reasons, only some representative examples are illustrated in Figures 2 to 4. In the Pareto charts (Figure 2), the standardized effects are plotted in decreasing

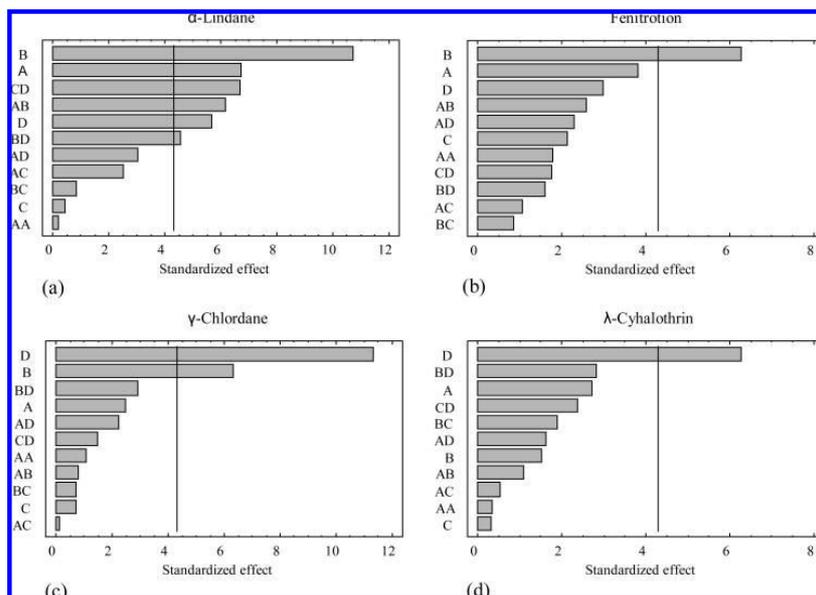


Figure 2. Pareto charts for α -lindane, fenitrothion, γ -chlordane, and λ -cyhalothrin.

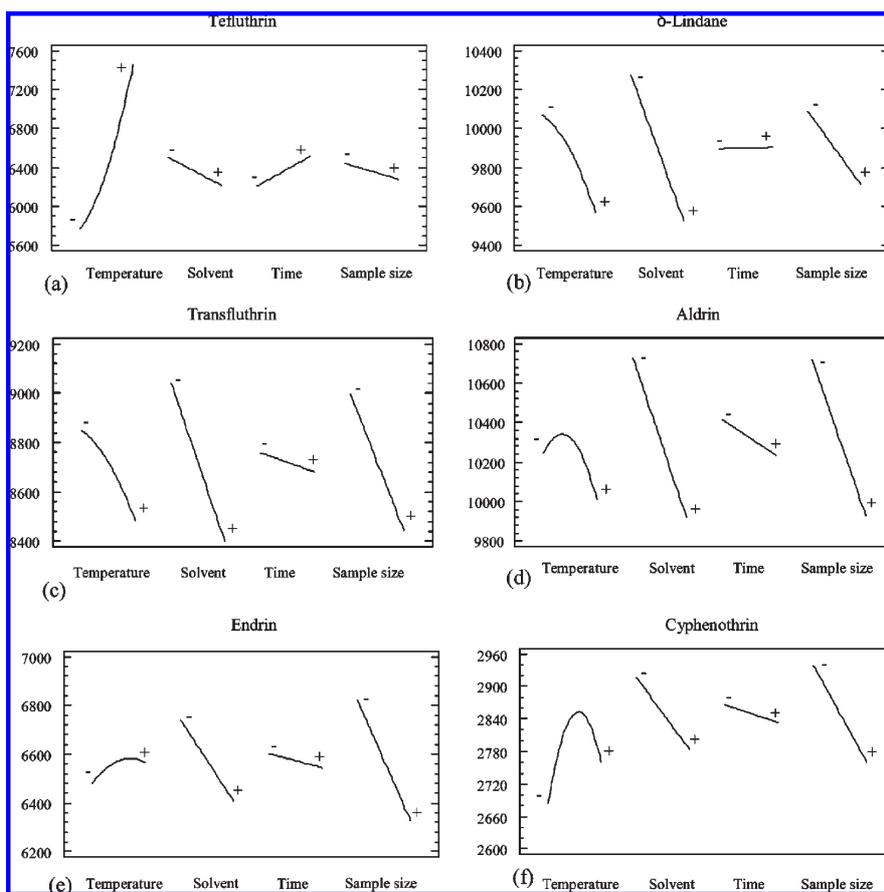


Figure 3. Main effect plots for tefluthrin, δ -lindane, transfluthrin, aldrin, endrin, and cyphenothrin.

order of absolute magnitude, thus making it easier to see which ones are the most important factors and interactions. In addition, the line drawn on the chart indicates whether an effect is statistically significant at a specified significance level (in this case, 95%). Main effect plots (Figure 3) show how the response varies when each factor is changed from its low level to its high level, while all other factors are held at the center of the experimental domain. Finally, in the interaction plots (Figure 4), the predicted response for each combination of the low and high levels of two factors is displayed at the end of each line segment.

Analyzing the Pareto charts (Figure 2), it was observed that solvent (B) and sample size (D) were the most important parameters for the extraction efficiency. For almost all of the

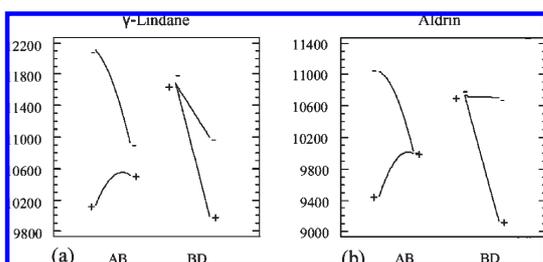


Figure 4. Temperature–solvent (AB) and solvent–sample size (BD) interaction plots for γ -lindane and aldrin.

pesticides for which factor B was significant, acetone/hexane led to higher recoveries (see Figure 3). Therefore, acetone/hexane was selected as the most efficient solvent for the extraction of the target compounds from cattle feed. Regarding sample size, in general, its effect was negative, meaning that higher responses and, thus, more efficient extractions were obtained working with 1 g of sample (see Figure 3). Influence of extraction temperature (A) was not so important in the studied range. In fact, this parameter was statistically significant only for four of the 36 compounds: α - and δ -lindane, tefluthrin, and endrin aldehyde. In the case of lindanes (see Figure 3 for δ -lindane), 80 °C was the optimal temperature, while 120 and 107 °C were the most favorable temperatures for tefluthrin (see Figure 3) and endrin aldehyde, respectively. A compromise solution was taken by selecting 100 °C as the most satisfactory extraction temperature. Finally, extraction time (D) was not a significant variable for any of the studied pesticides. With the aim of making experiments as short as possible, increasing sampling throughput, 5 min was chosen as the most adequate extraction time.

Table 4 summarizes the optimal conditions for the extraction of the target pesticides. The last columns also include the significant interaction effects. As can be deduced from this Table, only eight analytes showed significant second-order effects; moreover, these interactions did not change the optimal conditions selected after main effects analysis. As an example, Figure 4 shows the temperature–solvent (AB) and solvent–sample size (BD) interactions for γ -lindane and aldrin. AB interaction was

Table 4. Optimal Experimental Conditions Given for Each Compound by the $3 \cdot 2^{3-1}$ Mixed Level Fraction Design^a

	factors				interactions					
	temperature (°C)	solvent	time (min)	sample size (g)	AB	AC	AD	BC	BD	CD
α -lindane	80	acetone/hexane	5	1	*				*	*
β -lindane	80	acetone/hexane	5	1						
γ -lindane	80	acetone/hexane	5	3	*	*	*		*	*
tefluthrin	120	ethyl acetate	15	1						
δ -lindane	80	acetone/hexane	5	3	*	*	*		*	*
acetochlor	80	ethyl acetate	5	1						
transfluthrin	80	acetone/hexane	5	1						*
alachlor	80	ethyl acetate	15	1						
heptachlor	80	acetone/hexane	15	1						
fenitrothion	80	acetone/hexane	15	1						
aldrin	80	acetone/hexane	5	1	*				*	*
chlorpyrifos	80	acetone/hexane	15	1						
heptachlor epoxide	80	acetone/hexane	15	1						
allethrin	115	acetone/hexane	15	1						
γ -chlordane	80	acetone/hexane	5	1						
<i>p,p'</i> -DDE	80	acetone/hexane	15	1						
dieldrin	80	acetone/hexane	15	1						
endrin	120	acetone/hexane	15	1		*	*	*	*	*
endosulfan II	101	acetone/hexane	5	1						
<i>p,p'</i> -DDD	104	acetone/hexane	5	1						
endrin aldehyde	107	ethyl acetate	15	1	*			*	*	*
endosulfan sulfate	111	acetone/hexane	5	1						
<i>p,p'</i> -DDT	120	acetone/hexane	5	1						
endrin ketone	80	acetone/hexane	15	1	*					
tetramethrin	80	acetone/hexane	5	1						
methoxychlor	93	acetone/hexane	5	1						
λ -cyhalothrin	120	ethyl acetate	15	1						
cyphenothrin	108	acetone/hexane	5	1						
permethrin	109	ethyl acetate	15	1						
cyfluthrin	80	acetone/hexane	15	1						
cypermethrin	80	ethyl acetate	15	1						
fenvalerate	120	acetone/hexane	15	1						
deltamethrin	85	ethyl acetate	5	1						

^a Significant factors are in bold. *, refers to a significant interaction.

significant for α -, γ - and δ -lindane, aldrin, endrin aldehyde, and endrin ketone. In these cases, slight differences between the types of solvent were observed when working at 120 °C; however, at 80 °C, these differences were important, and better results were obtained when using acetone/hexane as solvent. Regarding the BD interaction, in general the extraction of 1 g of feed with both solvents led to comparable responses, while better efficacies were obtained with acetone/hexane when the sample size was 3 g.

After optimization of the investigated factors, the recommended procedure for the simultaneous extraction of the target pesticides in cattle feed was established as follows: temperature of 100 °C, acetone/hexane (1:1, v/v) as solvent, 5 min of extraction time, and 1 g of sample.

Several additional experiments regarding the number and type of filters placed at the bottom of the PSE cell were performed. The use of two filters instead of one led to less muddy extracts. Cellulose and glass fiber filters were compared, and no differences between them were noticed; however, because of economic reasons, the former filters were selected, and thus, in the subsequent experiments one and two cellulose filters were placed at the top and at the bottom of the cell, respectively.

Concentration and Cleanup Strategies. An important improvement in the sensibility of the developed method was achieved by means of extract concentration. Aliquots of 1 mL of PSE extracts

were evaporated to dryness under nitrogen and rediluted with 200 μ L of ethyl acetate. A 5-fold increase in the peak areas of the target pesticides compared to those attained after the chromatographic analysis of the corresponding extracts without concentration was observed. In this way, the absence of losses by volatilization during solvent evaporation was demonstrated.

Because of the complexity of the studied matrix, even though a layer of alumina was included in the PSE extraction cell, interfering compounds present in the eluate had to be removed in order to minimize adverse effects for the target compound detection. Thus, several further cleanup procedures were investigated. First, 0.5 g of graphitized nonporous carbon was placed in the PSE cell on the top of alumina. In most cases, this procedure delivered colorless and lipid-free eluates leading to better chromatographic profiles. In general, the extracts obtained in this way were adequately clean for their direct analysis, even after concentration.

Nevertheless, in the case of extremely complex feed samples, this extra in situ cleanup may not be sufficient, and other cleanup assays were performed in order to find the best protocol for further purification. In this way, classical SPE using Silica, Alumina N, Florisil, and C18 Sep-Pak cartridges was tried. Alternatively, dispersive-SPE (dSPE) was evaluated with alumina, Florisil, a mixture of both, PSA, and silica. In both procedures

Table 5. Linearity, Precision, and Limits of Detection (LODs) and Quantification (LOQs) of the Proposed Method

code	pesticide	linearity <i>R</i>	precision (RSD, %)			LOD (ng g ⁻¹)	LOQ (ng g ⁻¹)
			within-a-day		among days		
			20 ng/g (<i>n</i> = 3)	100 ng/g (<i>n</i> = 3)	20 ng/g (<i>n</i> = 5)		
1	α -lindane	0.9996	9	6	14	0.05	0.17
2	β -lindane	0.9998	3	5	12	0.20	0.67
3	γ -lindane	0.9997	8	6	7	0.09	0.30
4	tefluthrin	0.9994	7	10	12	0.12	0.40
5	δ -lindane	0.9993	6	7	12	0.10	0.33
6	acetochlor	0.9999	4	8	4	1.8	6.0
7	transfluthrin	0.9996	13	4	11	0.10	0.33
8	alachlor	0.9988	12	9	12	1.8	6.0
9	heptachlor	0.9998	10	5	14	0.09	0.30
10	fenitrothion	1.0000	7	6	6	0.09	0.30
11	chlorpyrifos	1.0000	6	7	7	0.10	0.33
12	aldrin	0.9997	6	6	9	0.12	0.40
13	allethrin	0.9998	6	6	5	0.09	0.30
14	heptachlor epoxide	0.9999	4	6	11	0.30	1.0
15	γ -chlordane	0.9998	10	6	14	0.09	0.30
16	endosulfan I	0.9998	11	6	8	0.10	0.33
17	α -chlordane	0.9999	8	6	9	0.12	0.40
18	4,4'-DDE	0.9992	7	6	11	0.11	0.37
19	dieldrin	0.9999	8	6	14	0.11	0.37
20	endrin	0.9997	5	7	9	0.10	0.33
21	endosulfan II	0.9998	10	7	10	0.09	0.30
22	4,4'-DDD	0.9994	7	7	10	0.09	0.30
23	endrin aldehyde	0.9999	11	11	20	0.25	0.83
24	endosulfan sulfate	0.9998	10	7	8	0.13	0.43
25	4,4'-DDT	0.9993	14	6	20	0.30	1.0
26	endrin ketone	0.9999	10	7	11	0.12	0.40
27	tetramethrin	0.9996	11	9	9	0.80	2.7
28	methoxychlor	0.9999	11	6	20	0.70	2.3
29	λ -cyhalothrin	0.9993	7	7	9	0.24	0.80
30	cyphenothrin	0.9995	8	7	12	0.48	1.6
31	permethrin	1.0000	12	6	21	1.5	5.0
32	cyfluthrin	0.9983	3	8	4	1.3	4.3
33	cypermethrin	0.9990	10	8	10	0.60	2.0
34	flucythrinate	0.9993	2	8	3	0.90	3.0
35	fenvalerate	0.9996	14	10	11	1.3	4.4
36	deltamethrin	0.9993	14	5	11	1.5	5.0

(for further details see the Materials and Methods section), alumina led to good and similar results, although the background was slightly lower in the case of dSPE. Interfering chromatographic peaks still appeared in some samples, although most of them did not hamper the detection and quantitation of the analytes.

Thus, when additional removal of the coextracted matrix components was required, eluates were cleaned by dSPE using alumina as the sorbent.

Method Validation: Application to Real Samples. With the aim of verifying that the PSE/GC- μ ECD developed method was suitable for the quantitative determination of pesticides in cattle feed, method quality parameters were estimated (Table 5).

The instrumental linearity was evaluated at a concentration range between 1 and 100 ng mL⁻¹ (including six concentration

levels) using standard solutions prepared in ethyl acetate. Each concentration level was injected in triplicate, and the response function was found to be linear with correlation coefficients (*R*) higher than 0.9983.

Precision and limits of detection and quantification were assessed by analyzing spiked cattle feedstuff samples containing known concentrations of the investigated pesticides. Previous analysis of this sample did not show detectable concentrations of the target analytes. Method precision was studied within a day at two fortification levels (20 and 100 ng g⁻¹) and among days at 20 ng g⁻¹. RSDs for the intraday precision ranged from 2 to 14% with an average value of 7.6%, while the RSDs for the interday precision ranged from 3 to 21% with an average value of 10.8% (Table). The limits of detection (LOD) and limits of quantification (LOQ) of the overall method were calculated as the

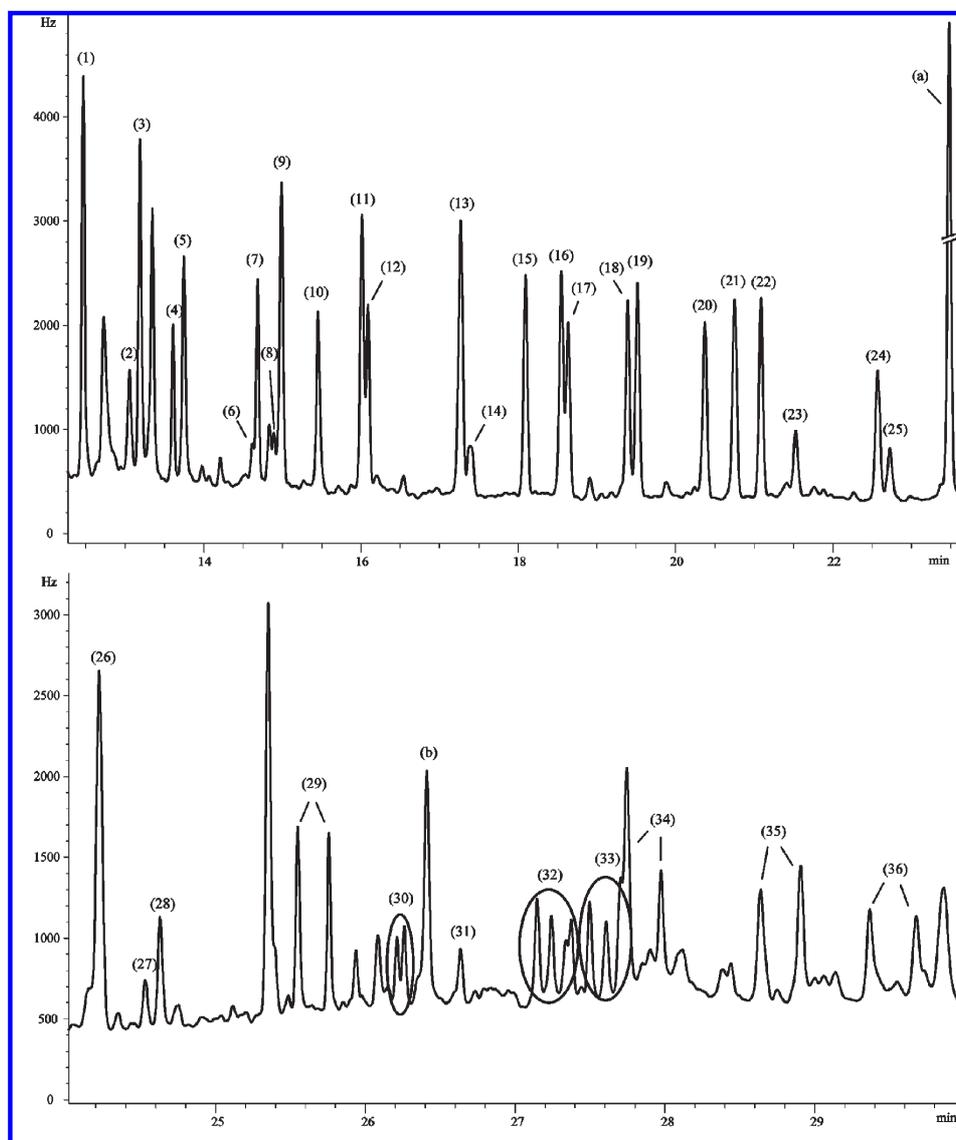


Figure 5. PSE/GC- μ ECD chromatogram of a spiked cattle feed sample (20 ng g⁻¹). See number code equivalence (1)–(36) in Table 5; (a) PCB-166, (b) PCB-195.

concentration giving a signal-to-noise ratio of 3 ($S/N = 3$) and 10 ($S/N = 10$), respectively. These limits were estimated using the PSE extract of a feedingstuff spiked at 5 ng g^{-1} . LODs and LOQs values were between the sub- ng g^{-1} and low- ng g^{-1} levels, and both were lower than the MRLs for the target pesticides in

cereals and animal feeds set by the European (EU) and American (US) legislations (see **Tables 1** and **5**). It must be also highlighted that these LODs were lower than those achieved in the same matrix by other authors (7–10, 18) and very close to those we have obtained using MSPD (11).

Figure 5 shows a chromatogram obtained for a cattle feed sample spiked with all of the target pesticides at a concentration level of 20 ng g^{-1} .

Recovery studies were carried out by applying the optimized PSE method to the extraction of five cattle feed samples (A–E) spiked at 100 ng g^{-1} with the target pesticides. Sample A was also fortified at 20 ng g^{-1} . Previous analyses of some of these samples showed the presence of some of the target analytes at low concentration levels ($< 10 \text{ ng g}^{-1}$), and these initial concentrations were taken into account to calculate the recoveries. As can be seen in **Table 6**, recoveries were between 70 and 110% for most compounds in all samples. The lower recovery for endrin aldehyde may be attributed to its strong retention on the solid adsorbents. In fact, a similar behavior has also been reported for the extraction of this endrin metabolite from animal feed and vegetables (9, 32). The observed variability (RSD) between the feedingstuff samples can be attributed to experimental error. These results demonstrate that the developed PSE/GC- μ ECD method allows the quantification of the target compounds in cattle feed samples of different composition.

Method accuracy was also evaluated by analyzing a certified reference material (BCR-115) containing some of the target pesticides. **Table 7** shows the estimated concentrations and the recovery values for the studied organochlorine pesticides. For γ -chlordane, β -lindane, γ -lindane, p,p' -DDE, dieldrin, endosulfan I, endrin, and heptachlor, the obtained values were in good agreement with the certified ones. Other target analytes (α -lindane, aldrin, heptachlor epoxide, p,p' -DDD, and p,p' -DDT) were also found in this sample. Although certified concentrations were not provided for them, values about (or below) the maximum content possible for each of these pesticides in the final material were obtained (33). Thus, the suitability of the optimized method for the analysis of pesticides at trace levels in cattle feed samples is demonstrated.

The validated method could then be employed for the analysis of the target pesticides in cattle feed samples collected from 23 dairy farms located in Galicia (NW Spain). No pesticide residues at levels exceeding the MRLs were found in any of the analyzed samples with the exception of one, in which the insecticide chlorpyrifos was detected at a concentration of 79 ng g^{-1} (above the legislated values in Europe for soya bean, maize, and wheat, and in US for maize; see **Table 1**).

The GC-MS analysis of this sample confirmed the presence of chlorpyrifos, and the corresponding ion chromatogram, as well as the full mass spectra, is shown in **Figure 6**. This insecticide was found in the other two samples at lower concentrations (8 ng g^{-1}). Other target analytes were found at low levels: endrin aldehyde ($3.1\text{--}4 \text{ ng g}^{-1}$), β -lindane (5.6 ng g^{-1}), fenitrotrion ($1.6\text{--}9.0 \text{ ng g}^{-1}$), endosulfan I ($1.1\text{--}5.3 \text{ ng g}^{-1}$), endosulfan II ($1.5\text{--}3.9 \text{ ng g}^{-1}$), and endosulfan sulfate ($1.7\text{--}3.4 \text{ ng g}^{-1}$).

Several samples were analyzed as well by the MSPD method previously developed by the authors (11). **Table 8** includes the comparative results obtained for one of these samples in which an organophosphorus pesticide (fenitrotrion), two organochlorine pesticides (endosulfan I and II), and one degradation product (endosulfan sulfate) were detected (see chromatogram in **Figure 7**). As can be seen in **Table 8**, equivalent values were obtained using the MSPD and PSE based procedures.

Therefore, pressurized solvent extraction coupled to GC- μ ECD detection has been successfully applied to the

Table 6. Recovery of Pesticides (%) from Several Cattle Feed Samples

pesticide	sample					
	A		B	C	D	E
	20 ng g^{-1}	100 ng g^{-1}				
α -lindane	94	98	93	91	99	90
β -lindane	86	95	85	90	90	85
γ -lindane	80	93	91	84	85	90
tefluthrin	73	87	94	70	77	82
δ -lindane	78	103	79	101	94	88
acetochlor	67	91	109	110	91	114
transfluthrin	74	94	91	85	80	82
alachlor	78	101	110	89	96	98
heptachlor	71	89	88	75	79	76
fenitrotrion	74	101	87	92	103	82
aldrin	78	90	101	86	86	84
chlorpyrifos	78	85	84	80	77	76
heptachlor epoxide	84	90	88	89	87	75
allethrin	79	86	74	78	84	
γ -chlordane	77	86	83	71	73	76
endosulfan I	60	80	85	72	77	72
α -chlordane	60	74	78	72	73	70
p,p' -DDE	86	92	91	80	81	83
dieldrin	73	83	80	71	72	73
endrin	88	91	85	79	81	81
endosulfan II	86	81	75	72	72	73
p,p' -DDD	74	80	85	81	81	87
endrin aldehyde	25	31	30	25	44	21
endosulfan sulfate	68	72	72	72	78	65
p,p' -DDT	114	101	86	81	88	58
endrin ketone	77	82	83	76	82	66
tetramethrin	79	80	100	80	100	81
methoxychlor	116	113	100	85	96	67
λ -cyhalothrin	90	93	99	90	94	85
cyphenothrin	94	102	107	98	99	100
permethrin	120	107	103	101	100	81
cyfluthrin	95	102	108	103	104	94
cypermethrin	92	95	107	91	99	101
flucythrinate	98	101	110	100	105	116
fenvalerate	119	109	100	107	114	120
deltamethrin	97	106	105	102	109	98

Table 7. Validation of the Method: Analysis of an Animal Feed Certified Reference Material (BCR-115)

pesticide	estimated concentration (ng g^{-1})	recoveries (%)
α -lindane ^a	18.7 ± 1.0	
β -lindane	24.9 ± 1.0	108
γ -lindane	21.3 ± 1.8	98
heptachlor	22.0 ± 3.4	116
aldrin ^a	15.1 ± 4.1	
heptachlor epoxide ^a	22.5 ± 5.4	
γ -chlordane	38.6 ± 5.6	80
endosulfan I	30.3 ± 3.3	66
4,4'-DDE	39.9 ± 4.2	85
dieldrin	11.9 ± 0.8	66
endrin	42.5 ± 7.9	92
p,p' -DDD ^a	43.8 ± 8.6	
p,p' -DDT ^a	35.6 ± 5.4	

^a Not certified.

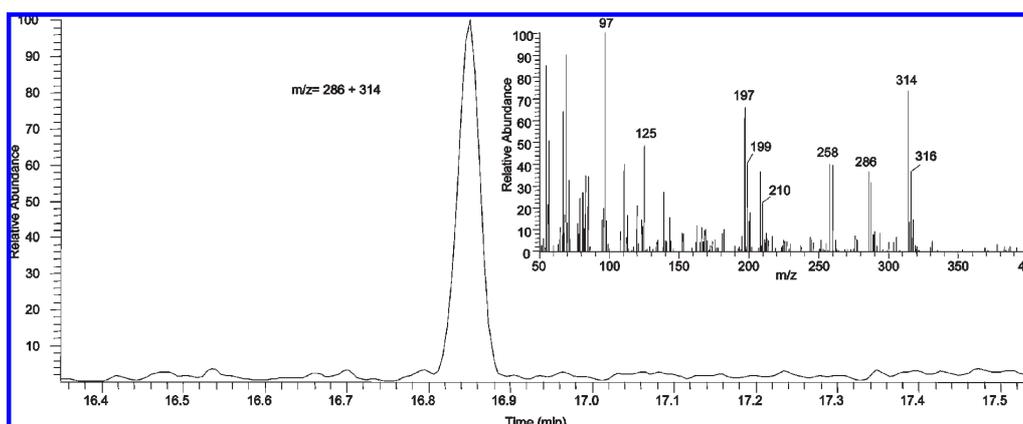


Figure 6. PSE/GC-MS reconstructed ion chromatogram (m/z 314 + 286) of a real cattle feed sample contaminated with chlorpyrifos. The obtained mass spectrum is also displayed.

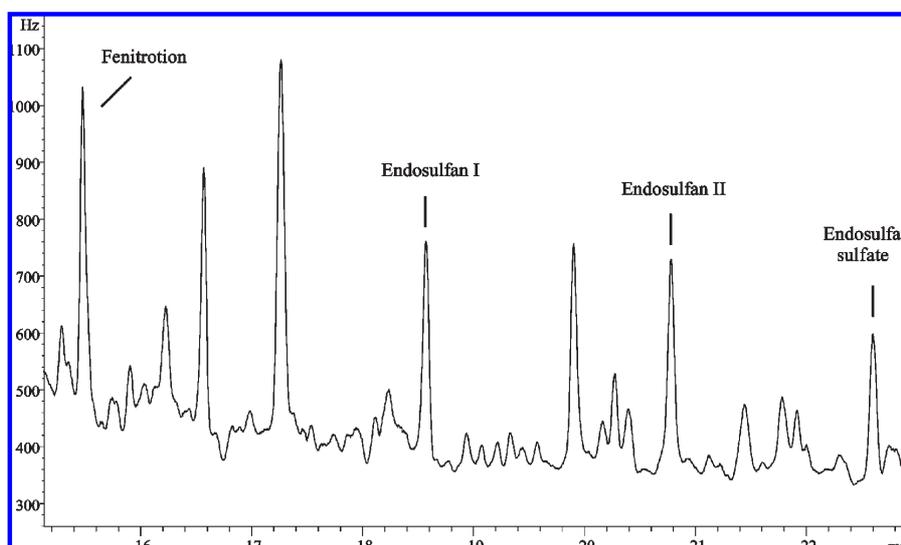


Figure 7. PSE/GC- μ ECD chromatogram of a cattle feed sample contaminated with several pesticides.

Table 8. Comparative analysis of a real cattle feed sample by PSE and MSPD

pesticide	concentration (ng g^{-1})	
	PSE	MSPD
fenitrothion	8.7 ± 1.5	9.3 ± 2.0
endosulfan I	3.4 ± 0.6	3.7 ± 0.4
endosulfan II	3.9 ± 0.7	3.8 ± 0.1
endosulfan sulfate	3.3 ± 0.2	3.8 ± 0.7

determination of multiclass pesticides in cattle feedstuffs. With the developed method, the most relevant criteria required for an extraction procedure, such as low solvent consumption, short process times, and possibility of automation, were fulfilled. Integrated cleanup strategies have been employed in order to simplify the sample preparation step as much as possible, and only in the case of extremely complex samples, a postcleanup step based on dSPE using alumina as adsorbent was needed.

LITERATURE CITED

- (1) New Rules on Pesticide Residues in Food. In *Directorate-General for Health and Consumers*, European Commission: Brussels, Belgium, 2008. http://ec.europa.eu/food/plant/protection/pesticides/explanation_pesticide_residues.pdf
- (2) Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council of 7 May 2002 on undesirable substances in animal feed, *Off. J. Eur. Comm.*, No. L140/10, 30 May 2002.
- (3) Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council of 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/EEC.
- (4) Commission Regulation (EC) No 839/2008 of 31 July 2008 amending Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council as regards Annexes II, III and IV setting maximum residue levels of pesticides in or on certain products.
- (5) United States Department of Agriculture (USDA), Foreign Agricultural Service, Maximum Residue Level Database. <http://www.fas.usda.gov/htp/MRL.asp> (last accessed Jan 2009).

- (6) Aulakh, R. S.; Gill, J. P. S.; Bedi, J. S.; Sharma, J. K.; Joia, B. S.; Ockerman, H. W. Organochlorine pesticide residues in poultry feed, chicken muscle and eggs at a poultry farm in Punjab, India. *J. Sci. Food Agric.* **2006**, *86*, 741–744.
- (7) van der Lee, M. K.; van der Weg, G.; Traag, W. A.; Mol, H. G. J. Qualitative screening and quantitative determination of pesticides and contaminants in animal feed using comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr., A* **2008**, *1186*, 325–339.
- (8) Gfrerer, M.; Chen, S.; Lankmayr, E. P.; Quan, X.; Yang, F. Comparison of different extraction techniques for the determination of chlorinated pesticides in animal feed. *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, *378*, 1861–1867.
- (9) Iglesias-García, I.; Barriada-Pereira, M.; González-Castro, M. J.; Muniategui-Lorenzo, S.; López-Mahía, P.; Prada-Rodríguez, D. Development of an analytical method based on microwave-assisted extraction and solid phase extraction cleanup for the determination of organochlorine pesticides in animal feed. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *391*, 745–752.
- (10) Walorczyk, S. Development of a multi-residue screening method for the determination of pesticides in cereals and dry animal feed using gas chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr., A* **2007**, *1165*, 200–212.
- (11) Fernandez-Alvarez, M.; Llompарт, M.; Lamas, J. P.; Lores, M.; Garcia-Jares, C.; Cela, R.; Dagnac, T. Development of a matrix solid-phase dispersion method for the simultaneous determination of pyrethroid and organochlorinated pesticides in cattle feed. *J. Chromatogr., A* **2009**, *1216*, 2832–2842.
- (12) EPA Method 3545, Pressurised Fluid Extraction. In *Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods*, 3rd ed., Final Update IV; EPA SW-846; U.S. GPO: Washington, DC, 2008.
- (13) Nieto, A.; Borrull, F.; Marce, R. M.; Pocurull, E. Pressurized liquid extraction of contaminants from environmental samples. *Curr. Anal. Chem.* **2008**, *4*, 157–167.
- (14) Adou, K.; Bontoyan, W. R.; Sweeney, P. J. Multi-residue method for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables by accelerated solvent extraction and capillary gas chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 4153–4160.
- (15) Pang, G.-F.; Liu, Y.-M.; Fan, C.-L.; Zhang, J.-J.; Cao, Y.-Z.; Li, X.-M.; Li, Z.-Y.; Wu, Y.-P.; Guo, T.-T. Simultaneous determination of 405 pesticide residues in grain by accelerated solvent extraction then gas chromatography-mass spectrometry or liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *384*, 1366–1408.
- (16) Nemoto, S.; Lehotay, S. J. Analysis of multiple herbicides in soybeans using pressurized liquid extraction and capillary electrophoresis. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 2190–2199.
- (17) Obana, H.; Kikuchi, K.; Okihashi, M.; Hori, S. Determination of organophosphorus pesticides in foods using an accelerated solvent extraction system. *Analyst* **1997**, *122*, 217–220.
- (18) Chen, S.; Gfrerer, M.; Lankmayr, E.; Quan, X.; Yang, F. Optimization of accelerated solvent extraction for the determination of chlorinated pesticides from animal feed. *Chromatographia* **2003**, *58*, 631–636.
- (19) Mendiola, J. A.; Herrero, M.; Cifuentes, A.; Ibañez, E. Use of compressed fluids for sample preparation: Food applications. *J. Chromatogr., A* **2007**, *1152*, 234–246.
- (20) Wilga, J.; Kot-Wasik, A.; Namieśnik, J. Comparison of extraction techniques of robenidone from poultry feed samples. *Talanta* **2007**, *73*, 812–819.
- (21) Syhre, M.; Hanschmann, G.; Heber, R. Cleanup procedure for monitoring chlorinated compounds in animal feed and crops. *J. AOAC Int.* **1998**, *81*, 513–517.
- (22) Argauer, R. J.; Lehotay, S. J.; Brown, R. T. Determining lipophilic pyrethroids and chlorinated hydrocarbons in fortified ground beef using ion-trap mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 3936–3939.
- (23) Spörting, S.; Björklund, E. Selective pressurized liquid extraction of polychlorinated biphenyls from fat-containing food and feed samples. Influence of cell dimensions, solvent type, temperature and flush volume. *J. Chromatogr., A* **2004**, *1040*, 155–161.
- (24) Garrido Frenich, A.; Martínez Vidal, J. L.; Cruz Sicilia, A. D.; González Rodríguez, M. J.; Plaza Bolaños, P. Multi-residue analysis of organochlorine and organophosphorus pesticides in muscle of chicken, pork and lamb by gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *558*, 42–52.
- (25) Gómez-Ariza, J. L.; Bujalance, M.; Giráldez, I.; Velasco, A.; Morales, E. Determination of polychlorinated biphenyls in biota samples using simultaneous pressurized liquid extraction and purification. *J. Chromatogr., A* **2002**, *946*, 209–219.
- (26) Draisci, R.; Marchiafava, C.; Ferretti, E.; Palleschi, L.; Catellani, G.; Anastasio, A. Evaluation of musk contamination of freshwater fish in Italy by accelerated solvent extraction and gas chromatography with mass spectrometric detection. *J. Chromatogr., A* **1998**, *814*, 187–197.
- (27) Carabias-Martínez, R.; Rodríguez-Gonzalo, E.; Revilla-Ruiz, P.; Hernández-Méndez, J. Pressurized liquid extraction in the analysis of food and biological samples. *J. Chromatogr., A* **2005**, *1089*, 1–17.
- (28) *Methods Optimization in Accelerated Solvent Extraction (ASE®)*; Technical Note 208; Dionex Corporation: Sunnyvale, CA, 2004.
- (29) Giergielewicz-Możajska, H.; Dąbrowski, Ł.; Namieśnik, J. Accelerated solvent extraction (ASE) in the analysis of environmental solid samples—Some aspects of theory and practice. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2001**, *31*, 149–165.
- (30) Gfrerer, M.; Lankmayr, E. DDT degradation during enhanced solid-liquid extractions. A consideration. *J. Chromatogr., A* **2005**, *1072*, 117–125.
- (31) *Extraction of Chlorinated Pesticides Using Accelerated Solvent Extraction (ASE®)*; Application Note 320 (Dionex); Dionex Corporation: Sunnyvale, CA, 2004.
- (32) Barriada-Pereira, M.; González-Castro, M. J.; Muniategui-Lorenzo, S.; López-Mahía, P.; Prada-Rodríguez, D.; Fernández-Fernández, E. Comparison of pressurized liquid extraction and microwave assisted extraction for the determination of organochlorine pesticides in vegetables. *Talanta* **2007**, *71*, 1345–1351.
- (33) Tuinstra, L. G. M. T.; Roos, A. H.; Griepink, B.; Maier, E. A. Certification of an animal feed reference material for the organochlorine pesticide contents: BCR CRM 115. *Fresenius J. Anal. Chem.* **1997**, *357*, 1035–1041.

Received for Review February 6, 2009. Revised manuscript received March 26, 2009. Accepted March 31, 2009. This research was funded by projects CTQ2006-03334 (CICYT, Ministerio de Ciencia y Tecnología, Spain) and PGIDIT05RAG50302PR (Xunta de Galicia). M.F.-A. and M.G.-C. would like to acknowledge their FPU and INIA doctoral grants from the Ministerio de Ciencia y Tecnología.

Monitoring of pesticide residues in dairy cattle farms from NW Spain

Maria Fernandez-Alvarez,^a J. Pablo Lamas,^a Maria Garcia-Chao,^b Carmen Garcia-Jares,^a Maria Llompart,^a Marta Lores^a and Thierry Dagnac^{*b}

Received 12th March 2010, Accepted 8th July 2010

DOI: 10.1039/c0em00054j

The consequences of the use of pesticides in agricultural activities for food and feed product safety are subjects of major concern. In the present work, simple and environmentally friendly methodologies were applied to the analysis of soil and cattle feed samples collected in dairy cattle farms from Galicia (NW Spain). This forms part of an integrated study aiming to investigate the global impact of the use of pesticides in such farms. The target compounds were 36 plant protection products belonging to different families. Organochlorine and organophosphorus pesticides were the most commonly detected compounds in the analyzed samples; pyrethroid and chloroacetanilide pesticides were also found in some of them, but not so frequently. Detected levels were rarely above the established legal limits.

Introduction

In Spain, agriculture and cattle farming still represent, together with industry of transformation and commercialization of farming products, some of the most important economic and social sectors.¹ Pesticides are broadly used in farming for their economic benefits to fight crop pests and reduce competition from weeds, thus improving yields and protecting the quality, reliability and price of production. Nevertheless, it is well known that the use of these compounds may result in negative consequences for people and other living creatures and the environment in general.² Part of the problem arises from the toxicity of the pesticides, but an even more important factor is the great quantity of these compounds currently used, and the environmental behaviour and persistence of certain plant protection products.

The most vulnerable reservoir of pesticide contamination is the soil, from which these compounds can be released into the atmosphere, ground or surface waters, or plants. In this manner, agricultural plants used for feeding of livestock may contain

pesticides; consequently, ingestion of contaminated pastures, ensiled fodders or feedingstuffs (elaborated from vegetal raw materials) by farm animals (*e.g.* cows, hens) may endanger their health and, because of the possible presence of such pesticide residues in livestock products (*e.g.* milk, eggs), human health could be also negatively affected.

Table 1 Reference levels in soil established by the Spanish legislation for some of the target pesticides.⁷

Pesticide	Generic reference level for human health protection/ng g ⁻¹		
	Industrial use	Urban use	Other uses ^a
Aldrin	1000	100	10
Chlordane	1000	100	10
4,4'-DDD	70000	7000	700
4,4'-DDE	60000	6000	600
4,4'-DDT	20000	2000	200
Dieldrin	1000	100	10
Endosulfan	60000	6000	600
Endrin	1000	100	10
Heptachlor epoxide	1000	100	10
α -Lindane	1000	100	10
β -Lindane	1000	100	10
γ -Lindane	1000	100	10

^a Including agricultural activities.

^aDepartamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Instituto de Investigación y Análisis Alimentario, Universidad de Santiago de Compostela, E-15706 Santiago de Compostela, Spain

^bINGACAL (Galician Institute for Food Quality)-CIAM (Agrarian and Agronomic Research Centre), Laboratory of Food/Feed Safety and Organic Contaminants, Apartado 10, E-15080 A Coruña, Spain. E-mail: thierry.dagnac@xunta.es; Fax: +34 981673656

Environmental impact

In Spain, agriculture and cattle farming still represent some of the most important economic and social sectors. Pesticides are broadly used in farming for their economic benefits, but their use may result in negative consequences for the environment. The main reasons are: their toxicity, the great quantity of these compounds currently used, and the environmental behaviour and persistence of certain plant protection products. The chain of transmission of pesticide residues expected in this context is soil–atmosphere/water/plants–feedingstuffs (elaborated from vegetal raw materials)–farm animals–livestock products (*e.g.* milk, eggs)–human health. Spain is one of the nine European Union Member States that currently have specific legislation related to soil protection, and in September 2008, a new regulation that covers products for human food but also those intended for animal feed, came into force in the EU. It is important to assess the degree of compliance with these standards in our nearby environment.

Table 2 Current European legislation regarding the maximum residue levels (MRLs) of the target pesticides in animal feed and in the most common ingredients used in the preparation of cattle feedingstuffs.^{8,9,11}

Pesticide	Legislation in animal feed relative to a feedingstuff with a moisture content of 12%		MRL ng g ⁻¹			
	Products intended for animal feed	MRL ng g ⁻¹	barley	soya bean	maize	wheat
Aldrin and dieldrin ^a	All feedingstuffs with exception of: fats	10 200	10	20	10	10
Chlordane ^b	All feedingstuffs with exception of: fats	20 50		20		
DDT ^c	All feedingstuffs with exception of: fats	50 500	50	50	50	50
Endosulfan ^d	All feedingstuffs with exception of: maize oilseeds	100 200 500	50	500	50	50
Endrin ^e	complete feedingstuffs for fish All feedingstuffs with exception of: fats	5 10 50	10	10	10	10
Heptachlor ^f	All feedingstuffs with exception of: fats	10 200	10	10	10	10
α -Lindane	All feedingstuffs with exception of: fats	20 200				
β -Lindane	Compound feedingstuffs with the exception of: feedingstuffs for dairy cattle	10 5				
γ -Lindane	Feed materials with exception of: fats All feedingstuffs with exception of: fats	10 100 200 2000	10	10	10	10
Methoxychlor			10	10	10	10
Cyfluthrin ^g			20	20	50	20
λ -Cyhalothrin			50	50	20	20
Cypermethrin ^g			2000	50	50	2000
Deltamethrin ^h			2000	50	2000	2000
Fenvalerate and esfenvalerate (<i>RR</i> + <i>SS</i>)			200	50	20	50
Fenvalerate and esfenvalerate (<i>RS</i> + <i>SR</i>)			50	50	20	20
Permethrin ^g			50	50	50	50
Phenothrin			50	50	50	50
Tefluthrin			50	50	50	50
Acetochlor			10	10	100	10
Atachlor			50	200	200	50
Chlorpyrifos			200	50	50	50
Fenitrothion			500	10	500	500

^a Aldrin and dieldrin singly or combined. ^b Sum of α - and γ -isomers and of oxchlordane. ^c Sum of 4,4'-DDT, 2,4'-DDT, 4,4'-DDE and 4,4'-DDD. ^d Sum of I and II isomers and of endosulfan sulfate. ^e Sum of endrin and of delta-ketoi-endrin, expressed as endrin. ^f Sum of heptachlor and of heptachlor epoxide. ^g Sum of isomers. ^h MRL for *cis*-deltamethrin.

In previous papers, the authors developed simple and environmentally friendly analytical methods based on the most advanced extraction techniques, followed by gas chromatography-microelectron capture detection (GC- μ ECD) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis, for the determination of a large number of multi-class pesticides including organochlorines, pyrethroids, organophosphorus compounds and chloroacetanilides in complex environmental and agro-food samples such as soil, cattle feed and bovine milk. The extraction procedures were based on solid-phase micro-extraction (SPME), matrix-solid phase dispersion (MSPD) and pressurized solvent extraction (PSE). These methodologies allowed quantification of these plant protection products at concentration levels below the legal limits established by Spanish and European legislation in such matrices.³⁻⁶

Spain is one of the nine European Union (EU) Member States that currently have specific legislation related to soil protection. Specifically, the Spanish government introduced in 2005 a regulation for assessing and managing the contaminated soils. According to this directive, a soil is declared contaminated when unacceptable risks for human health (or ecosystem) protection have been identified due to the presence of compounds listed in the 9/2005 Spanish Royal Decree (most of them being organochlorine and aromatic compounds). Generic reference levels according to the soil use (industrial, urban or other) were proposed in order to assess the soil pollution (see Table 1 for the target pesticides).⁷

From September 2008 onwards, a new regulation that covers not only products for human food but also those intended for animal feed, came into force in the EU. This regulation includes amended maximum residue levels (MRLs) for pesticides used in

Table 3 Organic matter (OM) content, crop type, USDA texture and grain size distribution of the analyzed soil samples.

Sample	OM (%)	Crop type	USDA texture	Grain size distribution (%)		
				Clay	Sand	Silt
A ₁	13	Grass	Sandy loam	15	63	23
A ₂	18	Maize/ry grass	Sandy loam	14	58	28
A ₃	12	Maize/maize	Sandy loam	13	58	29
B ₁	11	Grass	Sandy loam	14	64	23
B ₂	27	Maize/ry grass	Clay loam	29	29	43
C ₁	12	Grass	Sandy loam	15	66	20
C ₂	11	Maize/ry grass	Sandy loam	14	61	26
C ₃	13	Maize/maize	Sandy loam	12	66	22
D ₁	12	Grass	Sandy loam	15	55	30
D ₂	15	Maize/ry grass	Loam	20	43	37
E ₁	23	Grass	Silty loam	18	30	52
E ₂	16	Grass	Loam	23	45	33
F ₁	9.8	Grass	Sandy loam	9.0	75	16
F ₂	19	Maize/maize	Sandy loam	16	66	18
G ₁	9.5	Grass	Sandy loam	12	68	20
G ₂	19	Maize/maize	Sandy loam	17	60	23
H ₁	15	Grass	Sandy loam	12	72	16
H ₂	16	Maize/ry grass	Sandy loam	18	60	23
H ₃	9.0	Maize/maize	Sandy loam	13	71	17
I ₁	5.3	Grass	Loam	14	39	47
I ₂	5.2	Maize/ry grass	Loam	12	44	44
J ₁	16	Grass	Loam	24	32	45
J ₂	16	Maize/maize	Silty loam	20	28	52
K	10	Grass	Loam	11	46	43
L ₁	8.9	Grass	Sandy loam	11	52	37
L ₂	13	Maize/ry grass	Loam	13	47	41
M ₁	12	Grass	Sandy loam	18	53	29
M ₂	15	Maize/ry grass	Sandy loam	16	62	22
M ₃	11	Maize/maize	Sandy loam	17	62	21
N ₁	10	Grass	Sandy loam	14	65	21
N ₂	8.2	Maize/ry grass	Sandy loam	13	70	17
O ₁	10	Grass	Sandy loam	12	65	23
O ₂	5.3	Grass	Sandy loam	11	62	28
P ₁	19	Grass	Sandy loam	17	52	31
P ₂	13	Maize/ry grass	Loam	20	51	30
P ₃	14	Maize/maize	Loam	17	52	30
Q ₁	4.9	Grass	Sandy loam	11	69	20
Q ₂	6.7	Maize/maize	Sandy loam	8.9	72	19
R	7.5	Maize/maize	Loam	21	34	46
S	12	Grass	Clay loam	29	25	46
T ₁	13	Grass	Loam	26	32	43
T ₂	15	Maize/ry grass	Loam	26	32	42
U ₁	11	Grass	Loam	22	40	38
U ₂	12	Maize/ry grass	Loam	19	47	33
V	8.4	Grass	Loam	19	47	34

agriculture at present or in earlier times inside or outside the EU.⁸⁻¹⁰ According to the European directive 2002/32/EC on undesirable substances in animal feed, MRLs between 5 and 2000 ng g⁻¹ have been established for the most common organochlorine pesticides.¹¹ The current European legislation for the pesticides investigated in the present work with respect to their residues both in animal feed and in the most common cattle feed components (maize, barley, soya bean and wheat) are outlined in Table 2.^{8,9,11}

In the present work, the methodologies developed elsewhere⁴⁻⁶ have been applied to the analysis of pesticide residues, including organochlorines, pyrethroids, organophosphorus compounds and chloroacetanilides, in different soil and feedingstuff samples collected in dairy cattle farms from Galicia (NW Spain), as part of an integrated study that intended to know the global impact of the use of plant protection products in such farms.

Experimental

Reagents and materials

A standard mix solution containing organochlorine pesticides and some breakdown products (α -chlordane, methoxychlor, γ -chlordane, endrin ketone, endrin aldehyde, aldrin, α -lindane, β -lindane, γ -lindane, δ -lindane, 4,4'-DDD, 4,4'-DDE, 4,4'-DDT, dieldrin, endosulfan I, endosulfan II, endosulfan sulfate, endrin, heptachlor, heptachlor epoxide isomer B) with a concentration of 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of each compound in toluene-hexane (50 : 50), cypermethrin (mixture of isomers) and deltamethrin were obtained from Supelco (Bellefonte, PA, USA). Fenitrothion and alachlor were purchased from Dr Ehrenstorfer (Augsburg, Germany). Tefluthrin, transluthrin, allethrin (mixture of stereoisomers), tetramethrin, λ -cyhalothrin, cyphenothrin

Table 4 Method performance parameters in soil and cattle feed samples^{a-d}

Pesticide	Soil (SPME)				Cattle feed (MSPD, PSE)			
	Repeatability ^a (RSD, %)	LOD/ng g ⁻¹	LOQ/ng g ⁻¹	Recovery ^b (%)	Repeatability ^c (RSD, %)	LOD/ng g ⁻¹	LOQ/ng g ⁻¹	Recovery ^c (%)
α -Lindane	6.9	0.004	0.013	88	2.8, 7.5	0.03, 0.05	0.10, 0.17	85, 94
β -Lindane	3.5	0.020	0.067	85	2.1, 4.2	0.11, 0.20	0.38, 0.67	85, 89
γ -Lindane	10	0.015	0.051	74	2.5, 6.9	0.08, 0.09	0.25, 0.30	83, 87
Tefluthrin	3.7	0.004	0.012	109	1.9, 8.3	0.08, 0.12	0.28, 0.40	94, 81
δ -Lindane	7.8	0.045	0.15	80	2.6, 6.5	0.08, 0.10	0.26, 0.33	85, 91
Aetochlor	0.5	0.15	0.51	75	4.8, 5.8	1.2, 1.8	4.0, 6.0	90, 97
Transfluthrin	1.2	0.009	0.031	123	3.3, 8.6	0.08, 0.10	0.26, 0.33	91, 84
Alachlor	9.7	0.13	0.42	121	1.1, 10	1.5, 1.8	5.0, 6.0	84, 95
Heptachlor	6.3	0.018	0.061	102	1.5, 7.5	0.08, 0.09	0.28, 0.30	80, 80
Fenitrothion	1.3	0.16	0.52	147	1.4, 6.4	0.06, 0.09	0.21, 0.30	87, 90
Aldrin	3.4	0.012	0.041	66	3.0, 6.2	0.08, 0.12	0.26, 0.40	86, 88
Chlorpyrifos	1.1	0.033	0.11	75	1.6, 6.2	0.11, 0.10	0.38, 0.33	84, 80
Heptachlor epoxide	9.6	0.016	0.052	92	2.6, 6.0	0.06, 0.30	0.20, 1.0	85, 86
Allethrin	3.2	0.069	0.23	82	2.8, 4.8	0.30, 0.09	1.0, 0.30	87, 80
γ -Chlordane	2.8	0.010	0.033	94	3.2, 8.0	0.05, 0.09	0.18, 0.30	88, 78
Endosulfan I	3.5	0.027	0.089	73	1.7, 8.3	0.09, 0.10	0.30, 0.33	87, 74
α -Chlordane	1.0	0.022	0.072	71	4.3, 7.1	0.10, 0.12	0.32, 0.40	97, 71
4,4'-DDE	2.7	0.014	0.045	80	3.0, 6.5	0.10, 0.11	0.32, 0.37	88, 86
Dieldrin	6.5	0.028	0.094	83	4.1, 7.0	0.09, 0.11	0.30, 0.37	90, 75
Endrin	5.8	0.010	0.032	92	6.1, 5.8	0.06, 0.10	0.20, 0.33	93, 84
Endosulfan II	7.7	0.022	0.073	128	5.4, 8.3	0.05, 0.09	0.18, 0.30	85, 77
4,4'-DDD	4.2	0.012	0.041	74	2.8, 7.1	0.12, 0.25	0.40, 0.83	81, 81
Endrin aldehyde	5.2	0.15	0.51	89	5.9, 11	0.12, 0.25	0.40, 0.83	37, 30
Endosulfan sulfate	11	0.36	1.2	88	1.9, 8.6	0.09, 0.13	0.30, 0.43	87, 71
4,4'-DDT	1.3	0.19	0.62	95	5.9, 10	0.30, 0.30	1.0, 1.0	89, 88
Endrin ketone	8.8	0.033	0.11	91	2.8, 8.5	0.12, 0.12	0.40, 0.40	83, 78
Terramethrin	1.3	0.91	3.0	106	10, 9.8	0.75, 0.80	2.5, 2.7	96, 87
Methoxychlor	4.0	0.90	3.0	89	5.3, 8.5	1.05, 0.70	3.5, 2.3	94, 96
λ -Cyhalothrin	5.1	0.16	0.52	75	1.9, 6.9	0.21, 0.24	0.70, 0.80	80, 92
Cyphenothrin	5.9	0.36	1.2	122	1.7, 7.2	0.42, 0.48	1.4, 1.6	84, 100
Permethrin	2.9	0.45	1.5	95	1.7, 9.0	0.56, 1.5	1.2, 5.0	84, 102
Cyfluthrin	4.9	0.91	3.0	97	1.7, 5.8	0.90, 1.3	3.0, 4.3	88, 101
Cypermethrin	3.0	0.75	2.5	98	6.4, 8.8	0.54, 0.60	1.8, 2.0	93, 98
Flucythrinate	4.6	1.2	4.0	93	3.7, 5.3	0.90, 0.90	3.0, 3.0	81, 105
Fenvalerate	2.0	0.75	2.5	94	2.7, 12	3.0, 4.4	3.0, 4.4	93, 112
Deltamethrin	1.4	1.2	4.0	81	2.5, 9.7	1.5, 1.5	5.0, 5.0	80, 103

^a Concentration levels 10–50 ng g⁻¹, ^b Concentration levels 5–25 ng g⁻¹, ^c Concentration levels 20–100 ng g⁻¹.

Table 5 Recoveries of some of the target pesticides in two certified reference materials.^{4,6}

Pesticide	Soil (RTC-CRM818-050)		Cattle feed (BCR-115)	
	Certified value/ng g ⁻¹	Recovery (%)	Certified value/ng g ⁻¹	Recovery (%) MSPD, PSE
α -Lindane	394 ± 82	92		
β -Lindane	333 ± 34	109	23 ± 3	96, 108
γ -Lindane	416 ± 96	94	21.8 ± 2.0	75, 98
Heptachlor	194 ± 44	106	19.0 ± 1.5	99, 116
Aldrin	182 ± 35	103		
γ -Chlordane			48 ± 5	92, 80
Endosulfan I	318 ± 59	61	46 ± 4	66, 66
4,4'-DDE	417 ± 81	125	47 ± 4	89, 85
Dieldrin	344 ± 66	130	18 ± 3	118, 66
Endrin	340 ± 72	95	46 ± 6	89, 92
4,4'-DDD	553 ± 202	104		
Endosulfan II	357 ± 81	93		
Endrin aldehyde				
4,4'-DDT	446 ± 96	102		
Endosulfan sulfate	345 ± 61	96		
Methoxychlor	280 ± 75	113		
Endrin ketone				

(mixture of *cis* and *trans* isomers), permethrin (mixture of *cis* and *trans* isomers), cyfluthrin (mixture of isomers), flucythrinate, fenvalerate, chlorpyrifos and acetochlor were provided by Riedel-de-Häen (Seelze, Germany). Methanol (gradient grade), *n*-hexane (GC grade), isooctane (for organic trace analysis) and toluene (HPLC grade) were obtained from Merck (Mollet del Vallés, Barcelona, Spain), whereas acetone (pesticide grade) and ethyl acetate (HPLC grade) were supplied by Prolabo (VWR, Fontenay-sous-Bois, France). The water was deionised and further purified in a Milli-Q water purification system from Millipore (Bedford, MA, USA).

Individual standard stock solutions of 1.0–10.0 mg mL⁻¹ of pyrethroid, chloroacetanilide and organophosphorus pesticides were prepared in acetone, methanol, isooctane or ethyl acetate, depending on the compound. Intermediate mixture solutions of 100 µg mL⁻¹ in acetone were prepared from stock solutions and commercial organochlorine pesticide solution. All working solutions containing the target pesticides were prepared by convenient dilutions of the intermediate solutions in acetone (to spike soil and cattle feed samples) or ethyl acetate (to direct injection into the GC). Stock, intermediate and working solutions were stored in a freezer at -20 °C protected from light.

PCB-166 and PCB-195 (employed as internal standard and surrogate, respectively, in cattle feed analysis) were received as 10 µg mL⁻¹ solutions in isooctane from Dr Ehrenstorfer (Augsburg, Germany). Working solutions of PCB-195 in isooctane (1 µg mL⁻¹) were prepared by dilution of the commercial solution.

Sand (white quartz, 50–70 mesh, suitable for chromatography) was supplied by Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Anhydrous Na₂SO₄ was provided by Panreac (Barcelona, Spain). Neutral alumina (150 mesh) and Florisil (60–100 mesh) were achieved from Aldrich (Milwaukee, WI, USA), while graphitized nonporous carbon (Supelclean ENVI-Carb SPE Bulk Packing, 100–400 mesh) was obtained from Supelco. Florisil and alumina were activated at 130 °C for 12 h and then allowed to cool down in

a desiccator before being used. Graphitized nonporous carbon was prewashed with acetone, hexane, and ethyl acetate and then thoroughly vacuum-dried and kept in a desiccator.

Commercially available 85 µm polyacrylate (PA) fibre, housed in a manual SPME holder, was obtained from Supelco. Before the analysis, the fibre was conditioned at 300 °C during 2 h.

Samples

Forty five soil samples were collected from the superficial horizon (0–10 cm) of different locations in NW Spain. The grain size distribution, USDA texture and the organic matter contents are given in Table 3. These samples were collected from 23 dairy farms (soils from meadowlands, maize or maize/Italian ray-grass fields). After removing extraneous material, they were dried at 40 °C and sieved to 2 mm. Samples were kept in a freezer at -20 °C until 5–10 min before analysis.

Twenty seven cattle feed samples were also collected from these 23 dairy farms located in NW Spain. These feedingstuffs are very complex samples prepared by mixing several products (more than 10 in most cases) including a high percentage of various cereal meals (mainly barley, maize, wheat and soya bean), vegetal oils, oxides and salts. Cattle feed samples were ground, sieved at 2 mm, and stored at -20 °C for analysis.

Extraction procedures

For soil analyses, the headspace solid phase microextraction (HSSPME) technique was used. The sample (0.5 g) was placed in a 10 mL vial, 0.5 mL of Milli-Q water was added and the vial was then sealed with an aluminium cap and a PTFE-faced septum. The sample was left to equilibrate in a water bath at 100 °C for 5 min and the PA fibre was then exposed to the headspace over the sample for 30 min under stirring at the same temperature. After the exposure period, the fibre was thermally desorbed for 5 min at 290 °C into the GC injector port and the chromatographic analysis was carried out.⁴

Cattle feed samples were analyzed by two methodologies in which different extraction techniques were employed: MSPD and PSE. In all experiments, 10 µL of PCB-195 surrogate solution (1 µg mL⁻¹) was added to each sample before extraction.

In the MSPD procedure, 1 g of cattle feed sample was gently blended with 2 g of alumina and 200 mg of anhydrous Na₂SO₄ into a glass mortar using a glass pestle until a homogeneous mixture was obtained (*ca.* 5 min). Once the blending process was complete, the mixture was transferred into a column with a polypropylene frit at the bottom and filled with 2 g of Florisil (co-column). A second frit was placed on top of the sample before compression with a syringe plunger. Elution was made by gravity flow with ethyl acetate, collecting 5 mL of eluent into a graduated conical tube. Then, 1 mL of extract was evaporated to dryness under a nitrogen stream and the dry residue was re-dissolved with 200 µL of ethyl acetate and 1 µL of PCB-166 internal standard solution (10 µg mL⁻¹) was added. Finally, 1 µL of the extract was injected directly into the GC systems.⁵

In the PSE procedure, extractions were performed on an ASE 200 system (Dionex, Co., Sunnyvale, CA, USA) equipped with a 24-sample carousel, 11 mL stainless steel cells, and 40 mL collection vials. One and two cellulose filters were placed at the

Table 6 Calculated concentrations of the identified pesticides in the analyzed soil samples (n.d.: not detected; LOD: limit of detection; LOQ: limit of quantification). Samples denoted with the same letter but with different subscript refer to soils collected in the same farm, but in different plots. γ LI (γ -lindane), δ LI (δ -lindane), ACE (acetochlor), ALA (alachlor), HEP (heptachlor), FEN (fenitrothion), ALD (aldrin), CHL (chlorpyrifos), EPO (heptachlor epoxide), DDE (4,4'-DDE), DIE (dieldrin), DDD (4,4'-DDD), DDT (4,4'-DDT), TET (tetramethrin), CYP (cyphenothrin), PER (permethrin). Numbers in bold indicate concentration levels above the Spanish reference levels.

Sample	Calculated concentration/ng g ⁻¹															
	γ LI	δ LI	ACE	ALA	HEP	FEN	ALD	CHL	EPO	DDE	DIE	DDD	DDT	TET	CYP	PER
A ₁	2.3	2.3	n.d.	n.d.	n.d.	14	0.1	14	n.d.	2.5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
A ₂	n.d.	5.4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.1	8.0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
A ₃	2.3	1.0	36	41	3.6	n.d.	n.d.	6.8	n.d.	3.9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
B ₁	2.0	3.3	35	8.3	n.d.	12	<LOD	8.4	n.d.	3.0	n.d.	0.5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
B ₂	1.6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
C ₁	n.d.	0.9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	14	n.d.	7.6	n.d.	0.3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
C ₂	0.4	0.9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.6	n.d.	5.3	n.d.	0.4	1.7	n.d.	n.d.	n.d.
C ₃	0.2	1.4	n.d.	4.9	n.d.	n.d.	n.d.	3.8	n.d.	8.0	n.d.	0.4	2.7	n.d.	n.d.	n.d.
D ₁	5.3	4.6	5.0	n.d.	n.d.	21	0.1	3.2	0.3	0.6	n.d.	n.d.	n.d.	43	n.d.	n.d.
D ₂	2.9	3.7	n.d.	6.4	n.d.	19	0.1	2.9	0.2	0.3	n.d.	n.d.	n.d.	46	n.d.	n.d.
E ₁	3.0	3.0	n.d.	7.3	n.d.	26	n.d.	3.8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
E ₂	2.8	4.3	n.d.	n.d.	n.d.	14	0.1	1.8	0.3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	7.5	5.5	n.d.
F ₁	3.6	3.7	n.d.	7.6	n.d.	19	0.1	2.6	n.d.	10	n.d.	0.8	3.0	n.d.	n.d.	n.d.
F ₂	2.4	n.d.	25	4.2	n.d.	n.d.	0.6	13	n.d.	7.6	n.d.	0.4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
G ₁	0.2	0.5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.2	4.7	n.d.	4.4	n.d.	0.3	1.8	23	n.d.	n.d.
G ₂	0.7	1.1	25	8.9	n.d.	n.d.	0.3	15	n.d.	3.7	14	n.d.	1.4	n.d.	n.d.	n.d.
H ₁	0.7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1.5	n.d.	0.1	n.d.	n.d.	n.d.	88	n.d.	n.d.
H ₂	0.2	0.7	33	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	10	n.d.	20	n.d.	1.4	3.1	n.d.	n.d.	n.d.
H ₃	0.2	2.5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.4	n.d.	10	n.d.	2.6	6.7	n.d.	n.d.	n.d.
I ₁	n.d.	2.3	n.d.	n.d.	n.d.	33	0.1	0.9	n.d.	0.6	n.d.	1.9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
I ₂	0.3	2.1	n.d.	n.d.	n.d.	26	0.1	0.8	n.d.	5.3	n.d.	0.4	1.3	n.d.	n.d.	n.d.
J ₁	4.1	6.0	n.d.	88	n.d.	n.d.	n.d.	9.2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	6.2	n.d.
J ₂	n.d.	3.3	5.4	54	n.d.	20	<LOD	15	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
K	n.d.	2.1	n.d.	n.d.	n.d.	25	<LOD	0.4	n.d.	0.4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
L ₁	0.4	4.7	n.d.	n.d.	n.d.	20	0.1	8.6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
L ₂	0.3	4.5	37	58	n.d.	20	0.1	8.6	n.d.	4.8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
M ₁	3.8	2.9	n.d.	n.d.	n.d.	20	0.1	2.8	n.d.	0.3	n.d.	n.d.	n.d.	6.7	4.7	n.d.
M ₂	1.5	2.6	n.d.	n.d.	n.d.	13	0.1	1.4	0.1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
M ₃	2.6	4.6	n.d.	10	n.d.	18	0.1	4.4	0.4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
N ₁	3.6	3.0	n.d.	1.9	n.d.	20	0.2	2.6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
N ₂	2.8	n.d.	n.d.	35	n.d.	20	0.1	3.2	n.d.	0.4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
O ₁	n.d.	2.0	n.d.	n.d.	n.d.	29	<LOD	0.3	n.d.	1.9	n.d.	0.3	n.d.	n.d.	3.3	n.d.
O ₂	n.d.	1.7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LOD	0.3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4.3	n.d.
P ₁	2.0	3.4	n.d.	n.d.	n.d.	13	0.1	1.7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	9.8
P ₂	2.6	4.0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4.6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P ₃	3.4	1.9	n.d.	5.1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.						
Q ₁	8.0	3.9	n.d.	n.d.	n.d.	25	0.2	3.2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Q ₂	1.0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	22	0.3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
R	8.4	3.6	n.d.	60	n.d.	35	0.1	19	0.4	0.8	19	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
S	2.1	2.8	27	n.d.	n.d.	18	0.1	1.7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	5.9
T ₁	5.1	5.8	37	n.d.	n.d.	43	0.2	6.2	0.5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	58	n.d.	n.d.
T ₂	5.5	3.5	118	7.7	n.d.	42	0.1	13	0.5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	47	n.d.	n.d.
U ₁	3.9	4.1	4.6	n.d.	n.d.	17	0.1	3.1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	5.6
U ₂	1.4	n.d.	58	n.d.	n.d.	n.d.	0.05	4.3	n.d.	0.7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
V	3.7	3.9	43	n.d.	n.d.	30	0.1	4.2	0.3	0.3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

top and at the bottom of the cell, respectively. A layer of 1 g of alumina under 0.5 g of graphitized nonporous carbon were introduced into the extraction cell, followed by the mixture between 1 g of sample and 1 g of anhydrous Na₂SO₄. Finally, the dead volume of the cell was filled up with clean sand. The cell was tightly closed and placed into the carousel of the ASE system. Extractions were performed using the preheat mode. The remaining variables were established as follows: acetone–hexane (1 : 1, v/v) as solvent, temperature of 100 °C, pressure of 1500 psi, flush volume of 60%, purge time of 90 s, one extraction cycle and 5 min of extraction time. The PSE extract (of approximately 15 mL) was concentrated to 5 mL under a nitrogen stream. At this point, a cleanup stage based on dispersive-solid-phase extraction (dSPE) was required in the case of extremely complex samples. In

this purification step, 500 mg of alumina were mixed with the extract (5 mL) and the mixture was shaken twice for 2 min. Then, the extract was filtered through a PVDF 0.22 μ m filter (Millex CV). 1 mL of the eluate was evaporated to dryness and re-diluted in 200 μ L of ethyl acetate. Finally, 1 μ L of PCB-166 internal standard solution was added, and 1 μ L of the final extract was injected in the GC systems.⁶

Chromatographic conditions

Gas chromatographic analyses were carried out in a Hewlett-Packard 6890 GC system equipped with a ⁶³Ni microelectron capture detector, a 7683B autosampler and a split/splitless injector. Data were acquired and processed by GC Chemstation

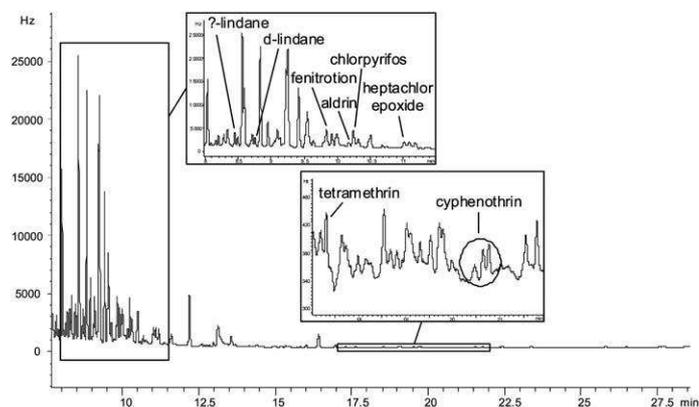


Fig. 1 GC- μ ECD chromatogram of soil sample E₂.

software. All pesticides were resolved in a HP-5MS (30 m \times 0.32 mm, 0.25 μ m film thickness) column. Helium was used as carrier gas at a constant flow rate of 1 mL min⁻¹, while nitrogen was used as makeup gas at 30 mL min⁻¹. The detector temperature was set at 300 °C. The injector operated in the splitless mode and was programmed to return to the split mode after 2 min from the beginning of a run. The injector temperature was 290 °C and 280 °C in soil and cattle feed analyses, respectively. The GC oven programme for soil analyses was as follows: 60 °C (held for 2 min), rate 30 °C min⁻¹ to 200 °C, rate 3 °C min⁻¹ to 230 °C, rate 4 °C min⁻¹ to 300 °C, with a total acquisition program of 34.17 min. For cattle feed analyses, temperature programme was as follows: 80 °C (held for 2 min), rate 15 °C min⁻¹ to 200 °C, rate 3 °C min⁻¹ to 235 °C (held for 1 min), and finally rate 20 °C min⁻¹ to 300 °C and (held for 10 min), with a total acquisition program of 35.92 min. For confirmation of positive results, some of the real samples were analyzed using a Varian 3400 CX gas chromatograph (Varian Chromatography Systems, Walnut Creek, CA, USA) equipped with a Varian 1079 split/splitless injector and coupled to a Varian Saturn 3 ion trap mass detector, operated in the electron impact ionization (EI) positive mode (+70 eV). The mass range was scanned in full scan mode from 45 to 500 *m/z* at 0.6 s scan⁻¹. Data were processed by Saturn GC-MS Workstation v5.4 software.

Some of the real soil and feed samples were also analyzed by GC-MS/MS using a Polaris Q ion trap mass detector (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) coupled to a Trace GC Ultra gas chromatograph equipped with an AS 3000 autosampler and a PTV injector. A 12 cm \times 2 mm i.d. Silcoseeve liner (ThermoFinnigan) was used in the injection port. 4 μ L of sample were injected onto the PTV injector in the constant flow mode set at 1 mL min⁻¹. The temperature of the injector was initially set at 70 °C, then increased to 280 °C at a rate of 14.5 °C s⁻¹ where it was maintained for 9 min. The PTV split/splitless valve was operated in the splitless mode until the temperature of 280 °C was achieved. Once the temperature stabilised, it was maintained for 1.7 min, then changed to the split mode. Compounds were separated on a 30 m \times 0.25 mm i.d. column, coated with 0.25 μ m of 95% dimethyl-5% phenyl

polysiloxane phase (Thermo TR-5ms, San Jose, CA, USA). The temperature of the column was initially set at 70 °C for 1 min, and then increased at a rate of 10 °C min⁻¹ to 190 °C. Once at 190 °C, the rate was increased to 5 °C min⁻¹ until it reached 240 °C and finally increased to 10 °C min⁻¹ to reach its final temperature of 320 °C, which was maintained for 10 min. Helium was used as the carrier gas at a constant flow of 1 mL min⁻¹. The transfer line was set at 320 °C with the external ion source at 280 °C. Electron impact ionization (EI) positive mode (+70 eV) was used in the mass spectrometer and the damping gas flow in the ion trap was set to 0.9 mL min⁻¹. The precursor ions were selected among the most intense characteristic ions of the MS spectrum, giving rise to the most efficient MS/MS transitions in the ion trap. Whenever possible, two or three product ions were monitored in full scan mode for unambiguous identification of the analytes.

Results

Method performance for feed and soil analyses

The analytical methods implemented for the pesticide analysis in the feed and soil samples were previously optimized and validated with certified reference materials (CRM).⁴⁻⁶ The method performance parameters as well as the recoveries for the CRM are summarized in Tables 4 and 5.

Analysis of soil samples

The HSSPME based extraction procedure detailed in the experimental section was applied to the determination of the target pesticides in 45 soil samples. Due to soil matrix effects, the standard addition protocol was required for accurate quantification purposes.

All evaluated samples were positive for some of the investigated pesticides (see Table 6). Some of the results were confirmed by GC-MS and GC-MS/MS. Organochlorinated pesticides were found in 100% of the analyzed samples, γ -lindane (detected in 84% of the soils) and δ -lindane (87%) being the most common ones. Pyrethroids were detected in 31% of the samples and the

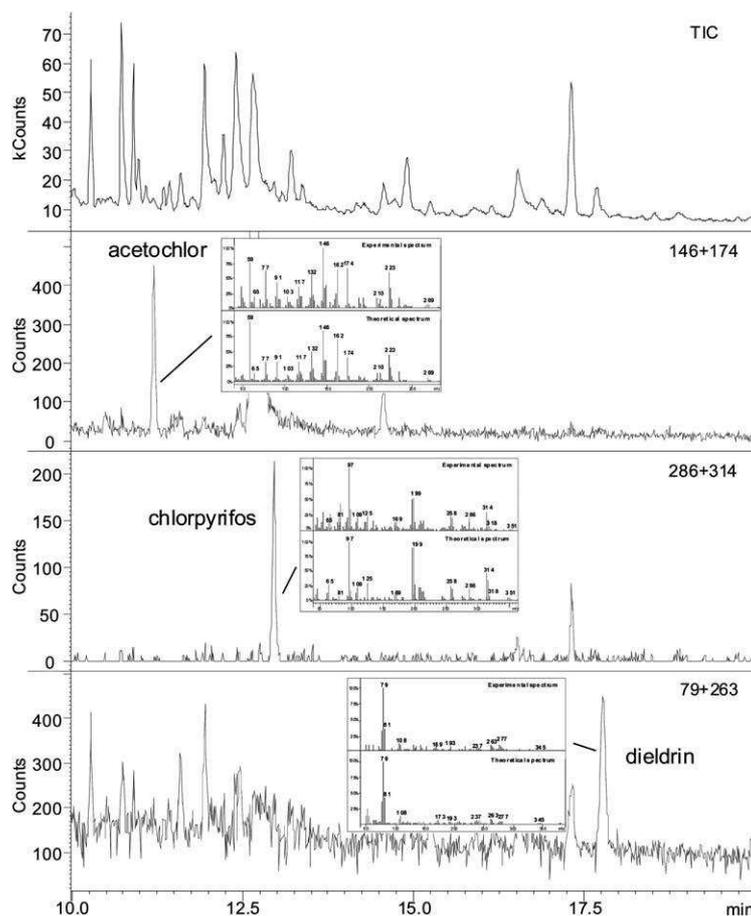


Fig. 2 TIC and ion GC-MS chromatograms of soil sample G_2 and mass spectra of acetochlor, chlorpyrifos and dieldrin.

most usual one was tetramethrin (18%). Finally, organophosphorus compounds and chloroacetanilides were found in 98% and 53% of the samples, respectively, the most frequent pesticides being chlorpyrifos (96%) and alachlor (38%). In two samples, (G_2 and R) dieldrin was detected at 14 and 19 ng g^{-1} levels, respectively. The maximum concentrations ranged from 118 ng g^{-1} (acetochlor) to 0.5 ng g^{-1} (heptachlor epoxide), while the average concentrations were between 0.1 ng g^{-1} (aldrin) and 40 ng g^{-1} (tetramethrin).

Fig. 1 depicts the GC- μ ECD chromatogram obtained for the E_2 sample containing several plant protection products: organochlorines (γ - and δ -lindane, aldrin, heptachlor epoxide), pyrethroids (tetramethrin, cyphenothrin) and organophosphorus (fenitrothion, chlorpyrifos).

Fig. 2 shows part of the total ion current (TIC) chromatogram obtained by GC-MS analysis of soil sample G_2 in which several

pesticides were detected (see Table 6). This figure also includes the ion chromatograms corresponding to acetochlor, chlorpyrifos and dieldrin, as well as their experimental and reference mass spectra.

Fig. 3 shows typical GC-MS/MS chromatograms for the pesticide analysis in an extract from a sandy-loam soil (sample F2). The reconstructed ion MS/MS chromatograms at m/z 146, 160 and 214 and the corresponding full MS/MS spectra, clearly confirm the presence of acetochlor, alachlor and chlorpyrifos in this soil sample.

Analysis of cattle feed samples

Both MSPD-GC- μ ECD and PSE-GC- μ ECD methods were applied to the analysis of the target compounds in 27 cattle feed samples collected in 23 dairy farms. Comparable results were obtained with the two validated proposed procedures. With the

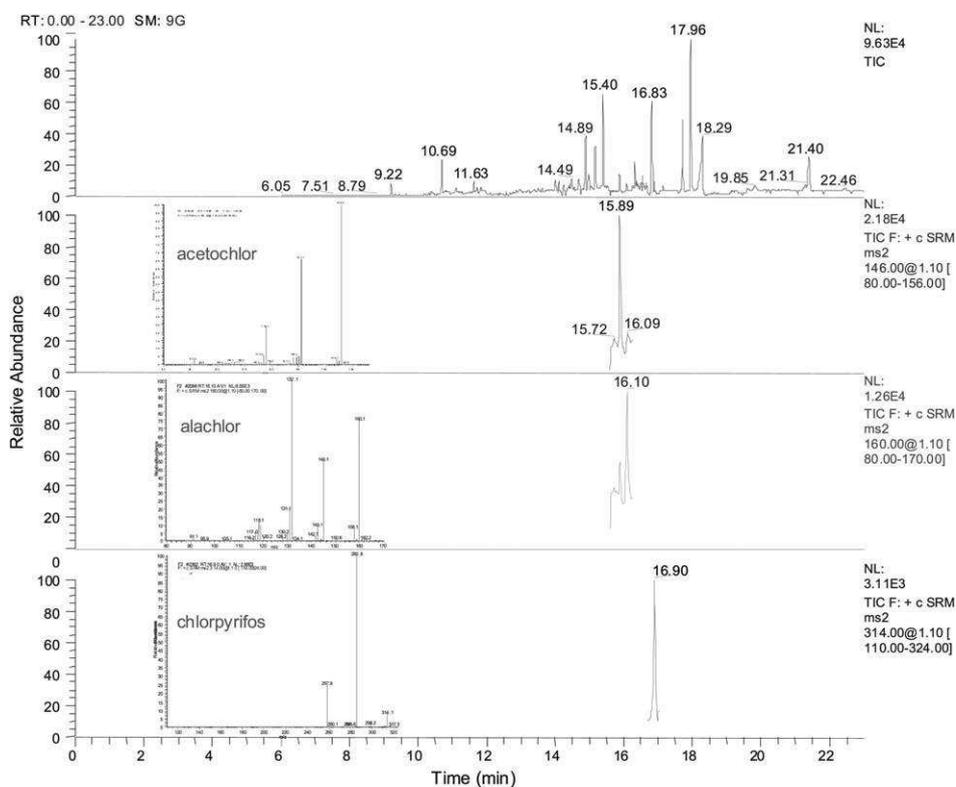


Fig. 3 Ion GC-MS/MS chromatograms of the soil sample F2 and full MS/MS spectra of acetochlor, alachlor and chlorpyrifos.

aim of confirming positive results, some of these samples were also analyzed by GC-MS and GC-MS/MS. The detected pesticides were quantified by internal standard calibration, using standard solutions prepared in ethyl acetate. The calculated concentrations of the identified pesticides in the positive cattle feed samples are summarized in Table 7. It is worth noting that, β -lindane was detected in samples D₂ and K at 5.7 and 5.6 ng g⁻¹; in sample B₂, fenitrothion was found at 14 ng g⁻¹, and chlorpyrifos was detected in sample O at 71 ng g⁻¹ (values above MRL, see discussion section).

Chlorpyrifos was detected in another four samples at lower concentrations (0.2–8.0 ng g⁻¹) and fenitrothion in another six (2.6–9.3 ng g⁻¹). Other target plant protection products detected at low levels were: endrin aldehyde (9.4–12.1 ng g⁻¹), alachlor (3.4 ng g⁻¹), endosulfan I (1.1–5.3 ng g⁻¹), endosulfan II (1.9–3.8 ng g⁻¹), endosulfan sulfate (1.7–3.8 ng g⁻¹) and tetramethrin (1.8–17 ng g⁻¹).

Fig. 4 shows the GC- μ ECD chromatogram obtained for sample G contaminated with alachlor (3.4 ng g⁻¹), fenitrothion (3.9 ng g⁻¹) and endosulfan II (2.0 ng g⁻¹).

Fig. 5 shows a typical GC-MS/MS chromatogram for the pesticide analysis in an extract from a feed sample (sample O). The reconstructed ion MS/MS chromatograms at *m/z* 314 and

260 and the corresponding full MS/MS spectra, clearly confirm the presence of chlorpyrifos and fenitrothion in this feed sample.

Discussion

Soil samples

Even though most of organochlorine pesticides have been banned several years ago, they are still in the environment due to their high persistence. In fact, these plant protection products, together with organophosphorus compounds, have been the most commonly detected compounds in the matrices investigated in the present work. Pyrethroids and chloroacetanilides were also found in some samples, but not so often.

Forty five soil samples were analyzed and all of them were positive for some of the studied pesticides (Table 6). Nevertheless, except in samples G₂ and R in which dieldrin was detected at 14 and 19 ng g⁻¹ levels, respectively, the remaining pesticides were found at concentration levels below the generic reference levels established by the Spanish legislation (Table 1).

The concentration levels of the persistent organochlorine pollutants detected in this study are generally lower than those registered in other recent surveys.^{12,13}

Table 7 Calculated concentrations of the identified pesticides in the positive cattle feed samples (n.d. not detected). Samples denoted with the same letter but with different subscript refer to samples collected in the same farm. β LI (β -lindane), ALA (alachlor), FEN (fenitrothion), CHL (chlorpyrifos), ENI (endosulfan I), ENII (endosulfan II), ENA (endrin aldehyde), ENS (endosulfan sulfate), TET (tetramethrin). Numbers in bold indicates concentration levels above the MRLs.

Sample	Calculated concentration/ng g ⁻¹								
	β LI	ALA	FEN	CHL	ENI	ENII	ENA ^a	ENS	TET
A	n.d.	n.d.	9.3	n.d.	3.7	3.8	n.d.	3.8	n.d.
B ₁	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1.3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
B ₂	n.d.	n.d.	14	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
C	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1.3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
D ₁	n.d.	n.d.	7.4	n.d.	3.4	2.5	n.d.	2.8	n.d.
D ₂	5.7	n.d.	n.d.	7.9	n.d.	n.d.	9.4	n.d.	n.d.
E	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2.1	2.4	n.d.	n.d.	n.d.
F	n.d.	n.d.	4.3	n.d.	n.d.	1.9	n.d.	n.d.	1.8
G	n.d.	3.4	3.9	n.d.	n.d.	2.0	n.d.	n.d.	n.d.
H	n.d.	n.d.	2.6	0.2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
I	n.d.	n.d.	n.d.	0.3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
J	n.d.	n.d.	7.2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	17
K	5.6	n.d.	n.d.	8.0	n.d.	n.d.	12.1	n.d.	n.d.
L	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3.0	2.8	n.d.	3.4	n.d.
M	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1.1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
N	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1.8	2.5	n.d.	1.7	n.d.
O	n.d.	n.d.	5.1	71	5.3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

^a Estimated value taking into account the mean recovery.

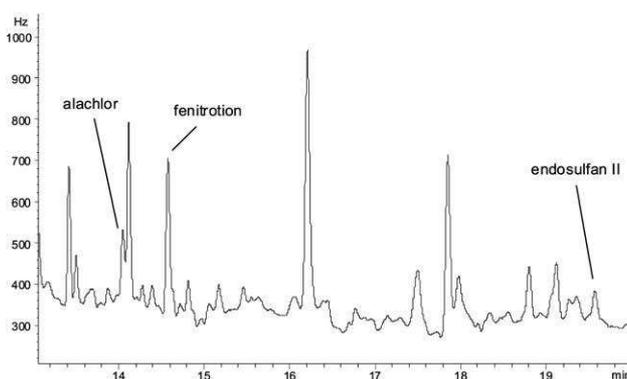


Fig. 4 GC- μ ECD chromatogram of cattle feed sample G contaminated with several pesticides.

As regards the modern pesticides, chlorpyrifos and alachlor were also among the most ubiquitous pesticides in soil samples collected in an intensive horticulture area in North Portugal.¹⁴

The average concentrations of all the quantified pesticides were not dependent on the crop type and on the crop rotations in the plots (grass, maize/ray grass, maize/maize).

In contrast, the average concentration of pesticides in the loam soils was twice the value obtained in the sandy-loam soils. Actually, the top five of the 'most contaminated' soils were five loam soils, with total pesticide concentrations ranging from 113 to 236 ng g⁻¹.

Cattle feed samples

Twenty-seven cattle feed samples of different composition were analyzed in order to evaluate the presence of the investigated

plant protection products. Pesticide residues were detected at concentration levels above the MRLs in some of the analyzed samples (Table 7). Thus, chlorpyrifos was detected in one of the samples at a concentration well above the allowed level in maize, wheat and soya bean.

In a study carried out in Poland¹⁵ with a very sensitive GC-MS/MS (triple quadrupole) method, 30% of the cereal and feed samples analysed contained detectable pesticide residues. Chlorpyrifos was detected in wheat grain at 320 ng g⁻¹.

In other analyzed samples, fenitrothion was also detected at a concentration higher than the corresponding MRL in soya bean. β -lindane was found in two samples at concentrations above the MRL in feedingstuffs for dairy cattle. Endrin aldehyde was detected in two samples at concentrations close to or above the MRL of its parent compound, endrin. Finally, traces of, alachlor, fenitrothion, chlorpyrifos, endosulfan I, endosulfan II,

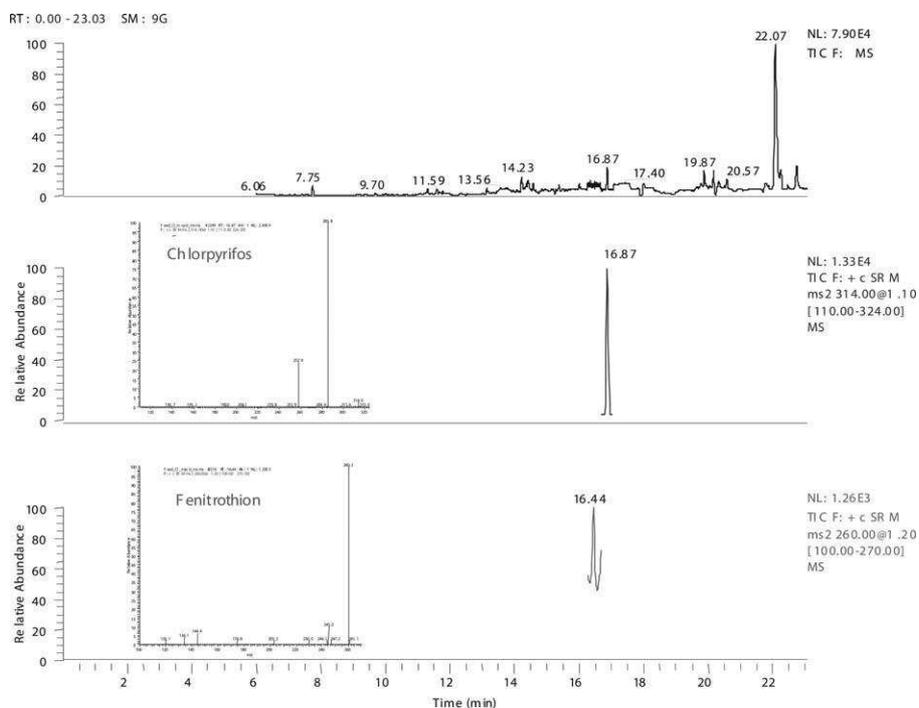


Fig. 5 Ion GC-MS/MS chromatograms of the cattle feed sample O and full MS/MS spectra of chlorpyrifos and fenitrothion.

endosulfan sulfate and tetramethrin were detected in some of these samples, but without exceeding the corresponding MRLs.

In the most recent study that we could find,¹⁶ a large number of pesticides were investigated in cereals, feed and milk from dairy sheep and goats. Endosulfan isomers I, II and endosulfan sulfate were the main pesticides detected at an average concentration of $5.4 \mu\text{g g}^{-1}$. In the same article,¹⁶ authors cite several studies where endosulfan was detected in feed and green fodder up to $6 \mu\text{g g}^{-1}$.

Conclusion

The HSSPME-GC- μ ECD methodology has been successfully applied to different topsoil samples with high content of organic matter, in which some of the pesticides evaluated have been identified and quantified. Only two soil samples exceeded the legal limits and for a single pesticide, dieldrin. Both the MSPD and the PSE coupled to GC- μ ECD have been effectively applied to the determination of several pesticides in cattle feed. Four of the cattle feed samples exceeded the limits for three of the pesticides analyzed: β -lindane, fenitrothion and chlorpyrifos. GC-MS was used for confirmation of positive results. The level of contamination by pesticides can be considered generally low in the samples analyzed. This study will be followed by an analysis of pesticide residues in maize forage, which, after ensiling, is a major component of the daily ration for bovines in NW Spain.

Acknowledgements

This research was funded by projects CTQ2006-03334 (CICYT, Ministerio de Ciencia y Tecnología, Spain) and PGIDI-T05RAG50302PR (Xunta de Galicia). M.F.-A. and M.G.-C. would like to acknowledge their FPU and INIA doctoral grants from the Ministerio de Ciencia y Tecnología. J.P.L. would like to acknowledge Xunta of Galicia for his Isabel Barreto contract.

References

- Spanish Environmental Profile 2007. *Indicators based report. Environment and Rural and Marine Ambient Department*. Spanish Government.
- Fact-Sheet: Agriculture and the environment*. European Commission, Directorate-General for Agriculture, Brussels, 2003; http://ec.europa.eu/agriculture/publi/fact/envir/2003_en.pdf.
- M. Fernandez-Alvarez, M. Llompарт, J. P. Lamas, M. Lores, C. Garcia-Jares, R. Cela and T. Dagnac, *Anal. Chim. Acta*, 2008, **617**, 37–50.
- M. Fernandez-Alvarez, M. Llompарт, J. P. Lamas, M. Lores, C. Garcia-Jares, R. Cela and T. Dagnac, *J. Chromatogr., A*, 2008, **1188**, 154–163.
- M. Fernandez-Alvarez, M. Llompарт, J. P. Lamas, M. Lores, C. Garcia-Jares, R. Cela and T. Dagnac, *J. Chromatogr., A*, 2009, **1216**, 2832–2842.
- M. Fernandez-Alvarez, M. Llompарт, J. P. Lamas, M. Lores, C. Garcia-Jares, M. Garcia-Chao and T. Dagnac, *J. Agric. Food Chem.*, 2009, **57**, 3963–3973.

-
- 7 Spanish Department of Presidency (2005) 9/2005 Royal Decree, Boletín Oficial del Estado 15/2005, 1833.
 - 8 Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council of 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/EEC.
 - 9 Commission Regulation (EC) No 839/2008 of 31 July 2008 amending Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council as regards Annexes II, III and IV setting maximum residue levels of pesticides in or on certain products.
 - 10 New rules on pesticide residues in food. In *Directorate-General for Health and Consumers*, European Commission: Brussels, 2008. http://ec.europa.eu/food/plant/protection/pesticides/explanation_pesticide_residues.pdf.
 - 11 Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council of 7 May 2002 on undesirable substances in animal feed, *Off. J. Eur. Comm.*, No. L140/10, 30 May 2002.
 - 12 I. Hilber, P. Mader, R. Schulin and G. S. Wyss, *Chemosphere*, 2008, **73**, 954–961.
 - 13 S. Tao, W. Liu, Y. Li, Y. Yang, Q. Zuo, B. Li and J. Cao, *Environ. Sci. Technol.*, 2008, **42**, 8395–8400.
 - 14 C. Gonçalves and M. F. Alpendurada, *Talanta*, 2005, **65**, 1179–1189.
 - 15 S. Walorczyk, *J. Chromatogr., A*, 2007, **1165**, 200–212.
 - 16 E. Tsiplakou, C. J. Anagnostopoulos, K. Liapis, S. A. Haroutounian and G. Zervas, *Chemosphere*, 2010, **80**, 504–512.