



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

FACULTADE DE CIENCIAS

Grado en Química

Memoria Trabajo Fin de Grado

***Determinación de herbicidas triazínicos y sus
metabolitos en el medio marino***

***Determinación de herbicidas triazínicos e os seus
metabolitos no medio mariño***

***Determination of triazine herbicides and their
metabolites in the marine environment***

Director(es):

María José González Castro

María Elisa Beceiro González

ROCIO UZAL VARELA

Curso: 2015/2016 – Convocatoria: Julio

Resumen

En este trabajo se han validado dos métodos para la determinación de nueve triazinas y ocho productos de degradación en agua de mar y sedimentos marinos. Los métodos se basan en la extracción en fase sólida (agua de mar) y la extracción mediante dispersión de la matriz en fase sólida (sedimentos), seguida de análisis por cromatografía de líquidos con detección con espectrometría de masas/masas (LC-MS/MS). La linealidad de las curvas de calibrado proporcionó $R^2 > 0.99$ para todos los compuestos en ambas matrices. Los LOQs oscilaron entre 0.05 y 0.45 $\mu\text{g/L}$ para agua de mar y entre 0.23 y 4.26 $\mu\text{g/kg}$ en sedimentos. La repetibilidad y reproducibilidad fueron menores de 1.41 % para todos los compuestos y las recuperaciones se encuentran en el rango de 87.5-99.4 % y de 60.9-99.7 % para agua de mar y sedimento respectivamente.

Palabras clave: Triazinas; Productos de degradación; Agua de mar; Sedimentos marinos; Cromatografía de Líquidos; Espectrometría de Masas

Neste traballo validáronse dous métodos para a determinación de nove triazinas e oito produtos de degradación en auga de mar e sedimentos mariños. Os métodos baséanse na extracción en fase sólida (auga de mar) e na extracción mediante dispersión da matriz en fase sólida (sedimentos), seguida de análise por cromatografía de líquidos con detección con espectrometría de masas/masas (LC-MS/MS). A linearidade das curvas de calibrado proporcionou $R^2 > 0.99$ para todos os compostos en ambas matrices. Os LOQs oscilaron entre 0.05 e 0.45 $\mu\text{g/L}$ para auga de mar e entre 0.23 e 4.26 $\mu\text{g/kg}$ en sedimentos. A repetibilidade e reproducibilidade foron menores de 1.41 % para todos os compostos e as recuperacións atópanse no rango de 87.5-99.4 % e de 60.9-99.7 % para auga de mar e sedimento respectivamente.

Palabras clave: Triazinas; Produtos de degradación; Auga de mar; Sedimentos mariños; Cromatografía de Líquidos; Espectrometría de Masas

In this work, two methods for the determination of nine triazines and eight degradation products in seawater and marine sediments were validated. The analytical methods are based on solid phase extraction (seawater) and extraction by matrix solid phase dispersion (sediments), followed by analysis by liquid chromatography with mass/mass spectrometry detection (LC-MS/MS). Linearity of calibration curves provide $R^2 > 0.99$ for all the compounds in both matrices. LOQs oscillate between 0.05 and 0.45 $\mu\text{g/L}$ for seawater and between 0.23 and 4.26 $\mu\text{g/kg}$ in sediments. Repeatability and reproducibility were below 1.41% for all compounds and recoveries ranged from 87.5-99.4 % and 60.9-99.7 % for seawater and sediment respectively.

Keywords: Triazines; Degradation products; Seawater; Marine sediments; Liquid chromatography; Mass Spectrometry

Indice

1. Introducción.....	1
1.1 Estructura	3
1.2 Propiedades físico-químicas	5
1.3 Distribución de los herbicidas en el medio ambiente.....	6
1.4 Productos de degradación	8
1.5 Medio marino.....	11
1.6 Legislación.....	12
1.7 Determinación de triazinas	13
1.7.1 Métodos de extracción	13
1.7.2 Métodos de concentración	15
1.7.3 Técnicas de determinación	15
2. Objetivos	17
3. Antecedentes	21
3.1 Agua de mar	23
3.2 Sedimentos marinos	25
4. Proceso experimental.....	27
4.1 Materiales y equipos.....	29
4.2 Reactivos.....	29
4.3 Preparación de disoluciones patrón.....	30
4.4 Método de extracción	30
4.4.1 Agua de mar	30
4.4.2 Sedimentos marinos	31
4.5 Lavado de material	32
4.6 Método cromatografía líquida-espectrometría masas/masas.....	32
5. Resultados y discusión.....	35
5.1 Validación del método instrumental	37
5.2 Determinación de triazinas en agua de mar.....	40
5.2.1 Método de extracción.....	40
5.2.2 Validación	41
5.3 Determinación de triazinas en sedimentos.....	46
5.3.1 Método de extracción.....	46
5.3.2 Validación	47
6. Conclusiones.....	53
7. Bibliografía	59

1.

Introducción

El uso de pesticidas surgió con el objetivo de reducir los daños ocasionados en los cultivos por las plagas y, de este modo, evitar la producción insuficiente de alimentos y conservar los ingresos procedentes de la agricultura. La creciente demanda de alimentos a nivel mundial trajo consigo un aumento del uso de pesticidas en el sector agrícola con el fin de que éste pudiese incrementar su producción, su calidad y satisfacer las necesidades de la población. A pesar de estas ventajas, el elevado uso de pesticidas tiene consecuencias negativas sobre el medio ambiente en donde los pesticidas se dispersan y se degradan, contaminando la atmósfera, el agua y el suelo.

Dentro de la familia de los pesticidas se encuentran los herbicidas, que se utilizan para minimizar los daños ocasionados en las cosechas por las malas hierbas. Este trabajo se centrará en los herbicidas triazínicos, que son un grupo de herbicidas selectivos que están presentes en las 10 fórmulas de herbicidas más utilizadas en Europa.

Las triazinas son un tipo de herbicidas introducidas por J.R. Geigy, Ltd en 1952, quien sintetizó los primeros derivados de la triazina. Desde el año 1960, el uso de herbicidas triazínicos se incrementó notablemente sobre todo en América del Norte y en Europa (Akdogan et al., 2013). En la actualidad siguen siendo una herramienta crucial para la producción agrícola mundial (Abbas et al. 2015), a pesar de estar considerados, aunque en menor grado que otros pesticidas, medioambientalmente peligrosos por su toxicidad, por su capacidad de bioacumulación y por ser disruptores endocrinos (LeBaron et al., 2008).

Estos herbicidas se utilizan en el sector agrícola como herbicidas pre- y post-emergentes en pastos y para combatir el crecimiento de las malas hierbas en diferentes cultivos, como los de maíz o los de cereales (Wang et al., 2010). Estos compuestos no siempre se utilizan con un fin agrícola, ya que también se utilizan para la esterilización del suelo o el mantenimiento de las carreteras (Papadopoulos et al., 2012). Los herbicidas triazínicos se aplican directamente en los suelos y se absorben a través de las hojas y raíces de las plantas, inhibiendo la fotosíntesis, y ocasionando por tanto, la muerte de la planta.

1.1. Estructura

Los herbicidas triazínicos presentan una estructura química heterocíclica análoga a la del benceno, en la que 3 átomos de nitrógeno sustituyen a 3 átomos de carbono. En función de las posiciones ocupadas por los átomos de nitrógeno, se originan 3 isómeros

Introducción

estructurales: 1,3,5-triazina, 1,2,4-triazina y 1,2,3-triazina. Las estructuras de los 3 isómeros se muestran en la **figura 1.1**.

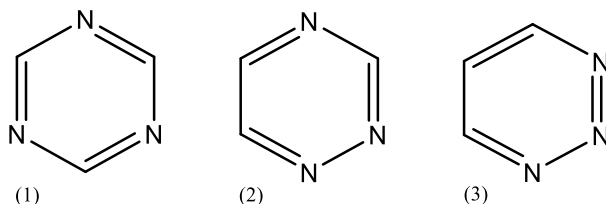


Figura 1.1. Isómeros estructurales. (1) 1,3,5-triazina; (2) 1,2,4-triazina; (3) 1,2,3-triazina

El más importante de estos isómeros es el 1,3,5-triazina también llamado *s*-triazina, ya que una gran parte de los herbicidas triazínicos derivan de dicho isómero. Este isómero es menos estable que el benceno porque la nube π del anillo se ve debilitada debido a la presencia de los átomos de nitrógeno, lo que produce un aumento de la densidad de carga en las posiciones 1, 3 y 5 y una disminución de carga en las posiciones 2,4 y 6 lo que facilita las reacciones de sustitución nucleófila en dichas posiciones (Pacáková et al., 1996).

Los derivados de la *s*-triazina se forman por la adición de sustituyentes en las posiciones 2,4 y 6 del anillo. En la posición 2 se suele introducir un grupo funcional metoxi (-OCH₃), tioalquil (-SCH₃) o cloruro (Cl), mientras que en las posiciones 4 y 6 se introducen grupos amino sustituidos, tal y como se recoge en la **figura 1.2**.

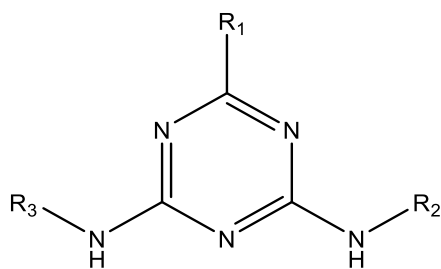


Figura 1.2. Estructura de la *s*-triazina con sustituyentes en las posiciones 2,4 y 6

El nombre comercial de los derivados de la *s*-triazina va a depender del sustituyente que ésta tenga en la posición 2. Si el sustituyente es un grupo funcional metoxi el nombre comercial termina en -ton, si es un grupo tioalquil termina el -trin y si se trata de un cloro termina en -azina (Pacáková et al., 1996; Abbas et al., 2015).

En este trabajo se estudiaron nueve triazinas, cinco clorotriazinas (atrazina, cianazina, propazina, simazina y terbutilazina) y 4 metiltio-triazinas (ametrina, prometrina, simetrina y terbutrina). Sus estructuras aparecen representadas en la **figura 1.3**.

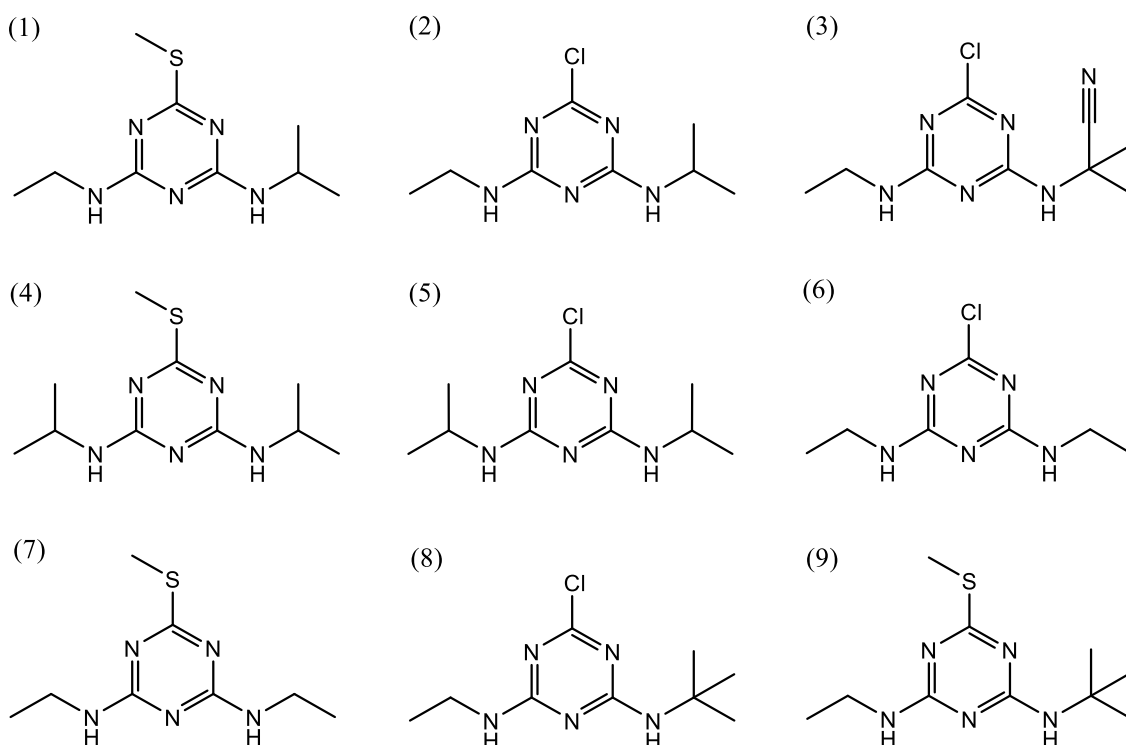


Figura 1.3. (1) Ametrina, (2) Atrazina, (3) Cianazina, (4) Prometrina, (5) Propazina, (6) Simazina, (7) Simetrina, (8) Terbutilazina, (9) Terbutrina

1.2. *Propiedades físico-químicas*

Las propiedades físico-químicas que presentan las triazinas que derivan de la *s*-triazina varían en función del sustituyente que ocupe la posición 2, mientras que los grupos amino de las posiciones 4 y 6 van a tener un efecto menor sobre sus propiedades. Las propiedades de los metoxi derivados y tiometil derivados son muy similares entre sí y presentan una mayor diferencia con respecto a los cloro derivados. Las *s*-triazinas son bases débiles, compuestos poco solubles y de baja polaridad (Pacáková et al., 1996; Abbas et al., 2015).

- Ácido-base

La basicidad de las triazinas se ve afectada principalmente por el sustituyente presente en la posición 2, aumentando según el siguiente orden: Cl < SCH₃ < OCH₃. En cambio, los grupos amino presentes en las posiciones 4 y 6 afectan ligeramente al carácter básico de las triazinas, pero éste se incrementa al aumentar el número de átomos de

hidrógeno presentes en los grupos amino y al aumentar la longitud y el número de ramificaciones de la cadena alquilo (Pacáková et al., 1996; Abbas et al., 2015).

Las clorotriazinas son bases muy débiles con un pKa que oscila entre 1.6 y 1.9, mientras que en el caso de las metoxitriazinas y metiltiotriazinas se encuentra entre 4.0 y 4.8. En medio acuoso y en suelos pueden existir en forma neutra o protonada dependiendo del pKa del compuesto y del pH del medio.

- Solubilidad y polaridad

La solubilidad y polaridad de las triazinas depende principalmente del sustituyente presente en la posición 2, aumentado según el siguiente orden: $\text{SCH}_3 < \text{Cl} < \text{OCH}_3$. Los sustituyentes en posiciones 4 y 6 hacen que la solubilidad disminuya a medida que aumenta la longitud de la cadena alquílica (Pacáková et al., 1996; Abbas et al., 2015).

La solubilidad de las s-triazinas en agua neutra a 20°C oscila entre 5 mg/L y 3000 mg/L y aumenta bruscamente a medida que el pH del medio acuoso se aproxima al pKa de la triazina (LeBaron et al., 2008), ya que se produce su protonación en el medio acuoso.

1.3. Distribución de los herbicidas en el medio ambiente

La contaminación ocasionada por los herbicidas triazínicos puede derivar de fuentes puntuales y de fuentes no puntuales; esta última se debe principalmente a las prácticas agrícolas. Estos herbicidas se aplican directamente en el suelo, son absorbidos por las raíces y hojas de las plantas y pueden filtrarse hasta llegar a aguas subterráneas, arroyos, ríos y lagos originando contaminación en sus aguas (Peterson et al, 2001). Además, se ha estimado que sólo el 0.1% de los herbicidas aplicados en los cultivos es absorbido, mientras que el resto permanece en el medioambiente (Li et al., 2010).

Por ello, a pesar de su complejidad, es importante conocer los mecanismos y procesos que puedan sufrir los herbicidas triazínicos una vez que entren en contacto con el medioambiente y conocer su evolución, que está condicionada por las características físicas, químicas y biológicas del suelo en el que se apliquen. La distribución de estas sustancias en el medio acuático así como sus propiedades tóxicas producen un importante problema de contaminación marina, lo que hace necesario conocer los procesos a través de los cuales estas sustancias llegan al entorno marino.

Existen tres procesos básicos que controlan la interacción de los herbicidas triazínicos cuando éstos entran en contacto con el suelo. Estos procesos son retención, transporte y transformación.

➤ Retención

La retención se debe a un fenómeno físico-químico que dificulta la movilidad de las triazinas, reduciendo de este modo su movimiento. El tiempo que la triazina esté inmovilizada en el suelo va a depender de la afinidad existente entre la triazina y el suelo (Calvet et al., 2005). El mecanismo principal de retención es la adsorción, que produce la acumulación de las especies químicas en la interfase de dos fases inmiscibles. Las interacciones existentes entre el suelo y las triazinas dependen del contenido en materia orgánica que tenga el suelo, de su pH, de su humedad y del contenido en arcilla (LeBaron et al., 2008). La retención disminuye la accesibilidad de los microorganismos a los herbicidas, afectando de este modo a su degradación (Schrack et al., 2009).

➤ Transporte

En un primer momento, los herbicidas entran en contacto con el suelo pero éstos también pueden ser transportados a otras zonas ambientales como la atmósfera, aguas superficiales o aguas subterráneas. El transporte de los herbicidas triazínicos se puede deber a la acción del agua (procedente de las precipitaciones o del riego de los cultivos) o de los seres vivos, por lo que pueden llegar a zonas alejadas del lugar de aplicación del pesticida (Calvet et al., 2005).

➤ Transformación

La transformación de las triazinas hace referencia a las modificaciones que éstas pueden sufrir en su estructura y en sus propiedades como consecuencia de diferentes transformaciones químicas, tanto de naturaleza abiótica como biótica, que pueden tener lugar tanto en aguas como en suelos y sedimentos (LeBaron et al., 2008).

Los herbicidas triazínicos no se adsorben en su totalidad, permaneciendo en el suelo y dado que sus presiones de vapor son relativamente bajas, tienden a evaporarse lentamente, pasando de este modo a formar parte de la atmósfera. Además de la presión de vapor de cada pesticida, hay otros factores que afectan a su volatilización como la temperatura ambiente, el contenido en agua del suelo o su adsorción en el suelo. Una vez en la atmósfera, los herbicidas pueden ser dispersados por corrientes de aire o por las precipitaciones. De este modo es posible que los pesticidas sean transportados y lleguen a lugares alejados con respecto a su lugar de aplicación (LeBaron et al., 2008).

En lo que respecta al medio acuático, el ciclo hidrológico es la principal vía de difusión de herbicidas desde sus puntos de aplicación a otros compartimentos ambientales, como las aguas subterráneas y superficiales (Masiá et al., 2013).

En las aguas subterráneas la lixiviación es el principal proceso de transporte. Ésta se produce cuando el agua procedente de las lluvias disuelve o arrastra a los pesticidas y se introduce en el suelo. La lixiviación se ve afectada por la capacidad de absorción del suelo, la estructura del suelo y la escorrentía. Con respecto a la adsorción y a la escorrentía, la lixiviación será mayor cuanto menor sean ambos procesos (Calvet et al., 2005). En el caso de los suelos de textura áspera, como margas arenosas, que tienen una alta permeabilidad y una gran capacidad de infiltración, el agua de la lluvia tiende a infiltrarse en lugar de correr en la superficie (Kalogridi et al., 2014).

Otro proceso de transporte de los herbicidas hacia las aguas subterráneas es el que se produce cuando los pesticidas se asocian a las macromoléculas orgánicas o a las partículas coloidales orgánicas o minerales que están presentes en el suelo (Calvet et al., 2005). Así el uso de herbicidas en muchos países se ha visto limitado debido a la preocupación por el aumento de compuestos triazínicos en las aguas subterráneas (Abbas et al., 2015).

En lo que respecta a las aguas superficiales, la transferencia de los herbicidas a este tipo de aguas se ve influenciada por diferentes factores como el clima, el tipo de suelo o las prácticas de uso de las tierras cultivadas (Calvet et al., 2005). Uno de los factores más importantes es el clima, especialmente el agua procedente de las precipitaciones. Si las precipitaciones son muy abundantes y se supera la capacidad de infiltración en el suelo, se va a producir escorrentía, llegando de esta forma a las aguas superficiales (Calvet et al., 2005). La movilización de los herbicidas en las aguas superficiales de los ríos, arroyos y torrentes permite el desplazamiento de estos compuestos hasta distancias considerables.

1.4. Productos de degradación

Las transformaciones que sufren las triazinas pueden estar originadas por procesos de degradación bióticos y abióticos como fotólisis, oxidación, hidrólisis y biodegradación, que conducen a la desalquilación de los grupos amino y descloración e hidroxilación (Carabias-Martínez et al., 2002). Los productos de degradación de las triazinas son más polares y tienen mayor movilidad que las triazinas, por lo que son transportados al medio acuático con más facilidad que sus precursores (Benvenuto et al., 2010).

- Degradación biótica

Esta degradación se debe a la acción de los microorganismos presentes en el suelo, en los sedimentos y en el agua. Esta degradación es lenta y va a verse condicionada por la concentración inicial de herbicida, la cantidad de microorganismos presentes, la humedad, la temperatura o el pH (Calvet et al., 2005). La degradación microbiana conduce fundamentalmente a la N-desalquilación de las cadenas laterales de las triazinas formando compuestos que aún conservan actividad fitotóxica.

- Degradación abiótica

Esta degradación depende del tipo de suelo, de la temperatura, de la humedad y de las características del compuesto que va a ser degradado. La degradación abiótica tiene lugar por la acción de enzimas que catalizan unas determinadas reacciones químicas entre las que se encuentran las reacciones de hidrólisis, reacciones fotoquímicas, reacciones de oxidación-reducción.

- Reacciones de hidrólisis. Los metabolitos hidroxilados pueden originarse en condiciones ácidas o básicas. Estas reacciones ocurren con mayor velocidad en el suelo que en el medio acuoso y están formadas por tres etapas que se muestran en la **figura 1.4**. En primer lugar, la cloro *s*-triazina es adsorbida en la superficie del suelo por interacciones hidrófobas de la cadena alquilo. Luego, un protón es transferido a uno de los átomos de nitrógeno del anillo aromático. Esta protonación facilita el ataque nucleófilo en el carbono de la posición 2 dando lugar al metabolito. La velocidad de la reacción de hidrólisis depende del pH, siendo mayor cuando menor es el pH (Krutz et al., 2009).

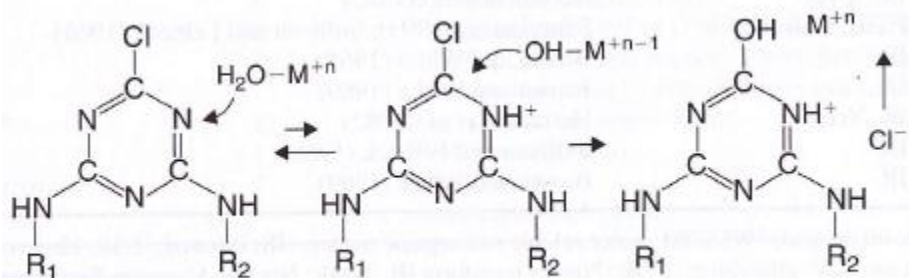


Figura 1.4. Reacción de hidrólisis de una cloro-*s*-triazina (LeBaron, 2008)

- Reacciones fotoquímicas. Este tipo de reacciones tienen lugar por la absorción de radiación. Pueden ser directas o indirectas dependiendo si la energía es absorbida directamente por la triazina o si es absorbida por el medio que la rodea

Introducción

(agua o suelo) (Calvet et al., 2005). La presencia de materia húmica influye en la forma de fotodegradación y acelera su velocidad. La velocidad de la fotólisis depende de los sustituyentes que la s-triazina tenga en la posición 2 y decrece en el orden $\text{OCH}_3 < \text{Cl} < \text{SCH}_3$, mientras que es independiente de la cadena alquílica.

- Reacciones de oxidación-reducción. Las reacciones de oxidación tienen lugar en presencia de oxígeno molecular o de otras especies activas de oxígeno, como el ozono. En las reacciones de reducción los electrones que captan los herbicidas proceden de la materia orgánica del suelo, de sulfuros o de metales reducidos (Calvet et al., 2005).

En este trabajo se estudian los ocho principales productos de degradación de triazinas en aguas y sedimentos, cuyas estructuras se recogen en la **figura 1.5**.

- Cuatro productos de degradación desalquilados: desetilatrazina (DEA), desetildesisopropilatrazina (DEDIA), desetilterbutilatrazina (DET) y desisopropilatrazina (DIA).
- Dos metabolitos hidroxilados: 2-hidroxiatrazina (HA) y 2-hidroxi-terbutilatrazina (HT).
- Dos metabolitos resultado de la combinación de desalquilación y descloración: desetil-2-hidroxiatrazina (DEHA) y desisopropil-2-hidroxiatrazina (DIHA).

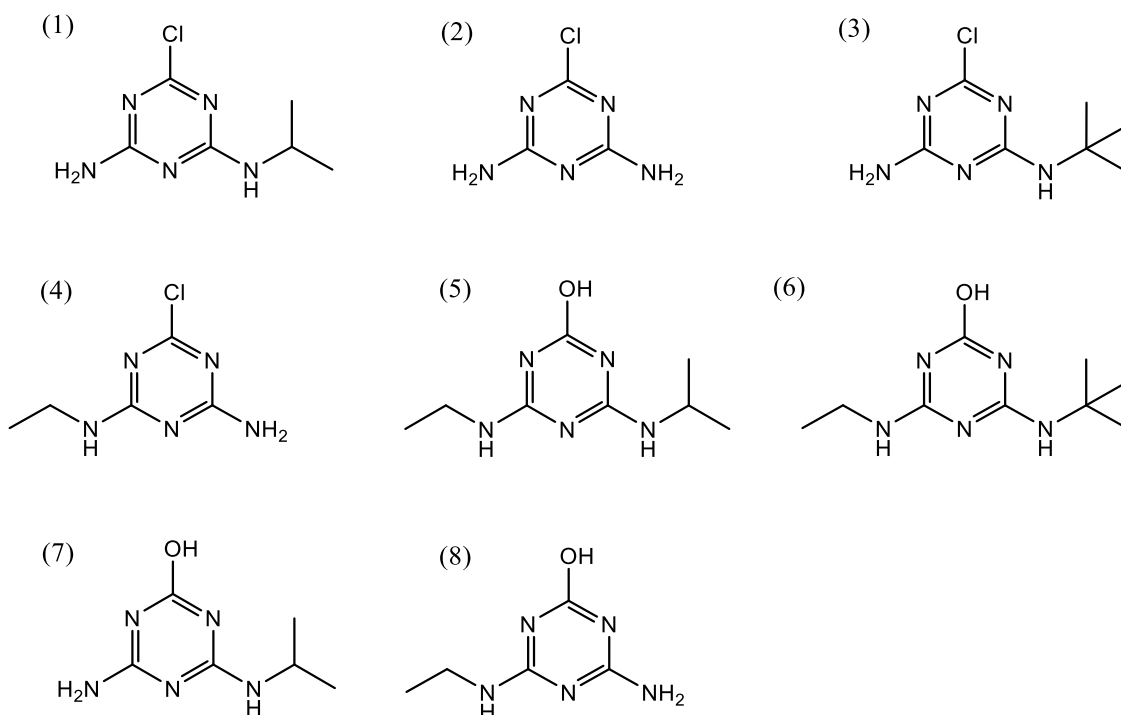


Figura 1.5. (1) DEA, (2) DEDIA, (3) DET, (4) DIA, (5) HA, (6) HT, (7) DEHA, (8) DIHA

1.5. Medio marino

Una vez que las triazinas y sus productos de degradación llegan al medio acuático, por los mecanismos de transporte explicados anteriormente, la probabilidad de que estos compuestos alcancen el medio marino es elevada. El ambiente acuático es un ecosistema constituido por numerosos elementos, tanto bióticos como abióticos interrelacionados entre sí y en equilibrio, por lo que es importante conocer los niveles de residuos de contaminantes en todos sus compartimentos, ya que cualquier alteración en alguno de los elementos que lo integran representa un riesgo para los demás.

En el medio marino los herbicidas se pueden presentar disueltos, en suspensión o en emulsiones que suelen formar en presencia de tensioactivos. Las triazinas van a interactuar con los sedimentos, cuya matriz tiene una gran complejidad, ya que está formada por organismos vivos, materia orgánica y partículas minerales.

Los sedimentos constituyen un hábitat para los organismos bentónicos y epibentónicos, que son unos componentes importantes en el entorno marino. Los sedimentos también pueden actuar como fuentes de herbicidas en el entorno marino a largo plazo dada su capacidad de adsorción de contaminantes orgánicos (Hela et al., 2005).

Las propiedades del sedimento que condicionan el movimiento de los pesticidas son la textura, la permeabilidad y el contenido de materia orgánica del sedimento. A pesar de que en la mayoría de los sedimentos el contenido de materia orgánica es bajo (2-10%), se trata de un componente muy importante del sedimento. La mayor parte del contenido en materia orgánica presente en los sedimentos está formado por sustancias húmicas, que son macromoléculas ácidas que presentan grupos carboxílicos y fenólicos (LeBaron et al., 2008). En lo referente a su textura, ésta afecta a la movilidad del agua a través del sedimento y como consecuencia a la de los productos disueltos en ella, como los herbicidas. La textura de un sedimento depende de las proporciones de arena, arcilla y lodo (Kalogridi et al., 2014).

La retención de los pesticidas en los sedimentos se le atribuye principalmente a la arcilla y al contenido de materia orgánica que presente ya que proporcionan numerosos puntos de unión para los pesticidas (Kalogridi et al., 2014). Estos puntos de unión pueden ser polares y apolares. Los puntos de unión polares pueden interactuar con grupos funcionales presentes en la molécula del herbicida pero también tienen una gran afinidad por el agua, por lo que las moléculas del herbicida van a estar compitiendo con el agua. Los puntos de unión no polares tienen una baja afinidad por el agua, dando lugar a una interacción más fuerte entre el sedimento y los grupos apolares de la

molécula del herbicida (LeBaron et al., 2008). Generalmente los pesticidas hidrofóbicos, (coeficiente reparto octanol/agua, $\log K_{ow} > 3$), tienen mayor tendencia a enlazarse al sedimento.

1.6. Legislación

Los herbicidas triazínicos son sustancias contaminantes pero aun así, son indispensables para un desarrollo sostenible de la agricultura moderna, por eso es necesario regular su uso de forma que no superen unas concentraciones máximas en el medioambiente.

Las primeras directivas en las que se establece un límite de concentración para pesticidas en aguas fueron la Directiva 80/778/CE del 15 de julio de 1980 y la Directiva 98/83/CE del 3 de noviembre de 1998 relativas a la calidad del agua destinada al consumo humano. Estos límites eran de 0.10 $\mu\text{g/L}$ para cada pesticida y de 0.50 $\mu\text{g/L}$ para el contenido total de pesticidas.

La directiva 2000/60/EC del Parlamento Europeo y del Consejo del 23 de octubre del 2000, establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas en el que exige medidas para el control de la contaminación. En una modificación posterior de esta normativa, la Decisión nº 2455/2001/CE del Parlamento Europeo y de Consejo del 20 de noviembre del 2001, se aprobó la lista de 33 sustancias prioritarias en el ámbito de política del agua incluyéndose la atrazina y la simazina.

Más adelante, en la directiva 2008/105/EC del Parlamento Europeo y del Consejo del 16 de diciembre de 2008 relativa a las normas de calidad ambiental en el ámbito de la política de aguas, se establecen las concentraciones máximas permitidas para la atrazina y la simazina en aguas superficiales, siendo de 2 $\mu\text{g/L}$ y 4 $\mu\text{g/L}$ respectivamente y se menciona la necesidad de establecer unas concentraciones máximas de contaminantes en sedimentos. Recientemente la directiva 2013/39/UE del Parlamento Europeo y del Consejo del 12 de agosto de 2013, que es la normativa que se encuentra en vigor actualmente, estableció la concentración máxima de terbutrina permitida en aguas superficiales en 0.34 $\mu\text{g/L}$.

En lo que respecta a límites máximos de residuos de triazinas en alimentos actualmente está en vigor el Reglamento 396/2005/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 23 de febrero de 2005 que establece los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal. En lo que respecta al medio marino,

este Reglamento establece para las algas límites de 10 y 50 µg/kg para simazina y terbutilazina respectivamente.

1.7. Determinación de triazinas

En los últimos años se han producido grandes avances en los métodos de análisis de herbicidas triazínicos. Los métodos de análisis de triazinas implican una etapa de extracción, en la que el analito es separado de su matriz, seguida de una etapa de concentración para permitir la detección del analito. Por último, una pequeña porción del extracto final es inyectada en un instrumento capaz de detectar y cuantificar selectivamente las triazinas presentes en la muestra.

1.7.1. Métodos de extracción

Extracción en fase sólida (SPE)

La extracción en fase sólida (SPE) es la técnica más utilizada para la preconcentración de triazinas en muestras de agua. Esta técnica se basa en la diferente afinidad que presenta el analito por una fase sólida o por la muestra líquida. La muestra se coloca en contacto con un adsorbente sólido (polar, apolar, de intercambio iónico, etc), que suele estar en el interior de un cartucho de vidrio o de polietileno, en donde los analitos y otros compuestos de la muestra que tengan unas propiedades químicas similares a las del adsorbente quedan retenidos. Posteriormente, en algunos casos, se realiza el lavado de los cartuchos para eliminar posibles sustancias interferentes y se lleva a cabo la elución de los analitos utilizando un disolvente que tenga una elevada afinidad por los analitos retenidos en el adsorbente (Abbas et al., 2015). Este método es el más empleado para la determinación de triazinas en muestras acuosas y permite realizar simultáneamente la extracción, purificación y concentración de la muestra. Además permite cambio de fase, conservación y transporte de la muestra y es fácilmente automatizable (Rodríguez-González et al., 2013).

Otra alternativa a los cartuchos son los discos de extracción, en los que el adsorbente se encuentra sobre una red de microfibras de politetrafluoroetileno formando un disco de 0.5 mm de espesor y de diferentes diámetros. Su principal ventaja es la posibilidad de concentrar analitos a caudales mayores que los utilizados en los cartuchos, ya que la transferencia de masa es más eficaz y no hay riesgos de formación de caminos preferentes.

Dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD)

La dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD) es una técnica de extracción y purificación introducida por Barker en 1989 para extraer residuos de medicamentos de tejidos animales. Este procedimiento permite la extracción de numerosos compuestos orgánicos, entre los que se encuentran los herbicidas triazínicos, de muestras sólidas, semi-sólidas y viscosas (Capriotti et al., 2013).

En esta técnica la muestra se mezcla en un mortero con un adsorbente sólido, que suele ser uno de los adsorbentes empleados en SPE con el objetivo de romper la estructura del material y conseguir una distribución homogénea de la muestra sobre las partículas del adsorbente. Una vez homogenizada, la mezcla se trasvasa a una columna con frit, se compacta y se realiza la elución de los analitos utilizando un pequeño volumen de un disolvente orgánico adecuado (García-López et al., 2008). A menudo, sobre todo en el caso de muestras biológicas, se coloca en la parte inferior de la columna un adsorbente adicional con el fin de conseguir una mayor limpieza del extracto.

La MSPD es una forma de cromatografía ya que la muestra es dispersada a lo largo de toda la fase sólida, convirtiéndose junto con el adsorbente en el nuevo material de empaquetado de la columna generando una nueva fase con propiedades cromatográficas específicas. Los componentes de la muestra son distribuidos sobre la superficie de la fase sólida como una función de interacciones con el soporte y los propios componentes de la matriz. El carácter específico de la nueva fase adsorbente/matriz y el rango de interacciones permite el aislamiento de analitos de diferente polaridad al pasar un disolvente a través de la columna. El analito adsorbido puede ser fácil y completamente eluido empleando un pequeño volumen de disolvente orgánico o una secuencia de disolventes.

En lo referente a la elución, ésta ofrece dos posibilidades. En la primera los compuestos interferentes de la matriz permanecen retenidos en la columna y los analitos son eluidos directamente. En la segunda, los analitos de interés permanecen retenidos en la columna y los compuestos interferentes son eliminados para a continuación eluir los analitos con un disolvente diferente (Kristenson et al., 2006).

La principal ventaja de esta técnica es que permite llevar a cabo varios pasos en la preparación de la muestra de manera simultánea, reduciendo de esta manera el tiempo de análisis y disminuyendo el consumo de disolventes, ya que la extracción y purificación de la muestra se realizan en un único paso (Ahmed, 2001).

1.7.2. Métodos de concentración

En los análisis de compuestos orgánicos en muestras medioambientales a niveles traza es necesaria una etapa de concentración de la muestra antes de llevar a cabo la separación cromatográfica, ya que la concentración de los analitos suele estar por debajo de los límites de detección y cuantificación de los equipos instrumentales.

Una forma rápida de concentrar los eluatos es utilizando un rotavapor, en el que el disolvente se elimina a presión reducida, lo que disminuye considerablemente su punto de ebullición, en un matraz que está rotando mecánicamente en un baño a una temperatura adecuada. El disolvente evaporado se condensa y se recoge.

Otra técnica de concentración consiste en pasar un flujo suave de un gas inerte, normalmente N₂, sobre la superficie del eluato. De esta forma se consigue desplazar el equilibrio líquido-vapor, ya que se elimina continuamente el vapor generado. Este es un procedimiento lento que se utiliza para volúmenes de disolventes pequeños (menores de 25 mL).

En el caso de analitos orgánicos volátiles es importante no llevar la evaporación del disolvente a sequedad en el rotavapor, ya que se pueden producir pérdidas de los compuestos de interés por su descomposición o volatilización. Si es necesario llevar el extracto a sequedad, debe hacerse sin calentamiento, burbujeando una suave corriente de un gas inerte.

1.7.3. Técnicas de determinación

La cromatografía de gases (GC) y la cromatografía de líquidos (LC) son las técnicas más utilizadas para la separación de triazinas. En los últimos años, el uso de LC se ha visto incrementado debido a una mayor sensibilidad de los detectores y a las limitaciones que presenta la GC, siendo la principal limitación su aplicación al análisis de productos de degradación hidroxilados, ya que debido a su polaridad no son muy volátiles.

Por ello, en este trabajo se empleará la cromatografía de líquidos (LC). Los detectores más utilizados en LC para el análisis de triazinas son el detector ultravioleta (UV) o el detector de red de diodos (DAD) y especialmente el detector de espectrometría de masas (MS), particularmente en modo masas/masas (MS/MS), ya que presenta una alta sensibilidad y selectividad (LeBaron et al., 2008). Por este motivo, en este estudio se realizará la detección mediante MS/MS.

Introducción

Las triazinas son relativamente polares, por lo que su separación por LC tiene que hacerse en fase inversa, es decir fase estacionaria apolar y fase móvil polar. Como fase estacionaria se suele utilizar una columna de C18 y como fase móvil es frecuente el uso de una mezcla acetonitrilo-agua (Rodríguez-González et al., 2015) o de metanol-agua (Wang et al., 2011). La separación cromatográfica depende de la distribución del analito entre la fase móvil y la fase estacionaria, que va a variar en función de su carácter hidrófilo o hidrófobo. Las triazinas presentan ambos comportamientos, ya que el anillo es hidrófilo y las cadenas aminoalquílicas presentes en las posiciones 4 y 6 son hidrófobas.

Además de su hidrofobicidad, es importante tener en cuenta el pKa de las triazinas y sus productos de degradación, ya que estos compuestos dependen fuertemente del pH. Por este motivo, en algunos casos es necesario utilizar una fase móvil con un tampón o un modificador. Entre las fases móviles con tampón o modificador más empleadas se encuentran acetonitrilo-disolución tampón de fosfato a pH 7.2 (Carabias-Martínez et al., 2002), metanol-disolución de ácido fosfórico a pH 4.7 (Akdogan et al., 2013), acetonitrilo-disolución de ácido acético (Gikas et al., 2012), acetonitrilo-formiato amónico y ácido fórmico (Li et al., 2013)

Una vez separadas, las triazinas llegan al detector, en este caso un espectrómetro de masas (MS). Este detector mide la relación masa/carga de los iones resultantes una vez que se fragmentan los compuestos. Los iones se forman en fase gaseosa, lo que hace posible el control de su movimiento a través de campos electromagnéticos. Este detector consta de tres componentes principales: una fuente de iones que genera iones a presión atmosférica, un analizador de masas que separa los iones en función de sus masas y el detector que detecta los iones.

Existen varios métodos de ionización, en este caso se emplea la ionización por electrospray (ESI). En este método se aplica una diferencia de potencial sobre la disolución que contiene al analito, dando lugar a pequeñas gotas cargadas que se fragmentan cada vez más hasta que tiene lugar la formación de los iones. En este trabajo se utilizó el detector de masas en tándem (MS/MS), que proporciona una mayor relación señal/ruido permitiendo una mayor sensibilidad y selectividad. En este caso, se seleccionan los iones con una relación m/z determinada generados inicialmente, estos iones vuelven a ser fragmentados y dichos fragmentos son analizados de nuevo.

2.

Objetivo

Objetivo

Los herbicidas triazínicos constituyen uno de los grupos de herbicidas más empleados a nivel mundial. Las triazinas son compuestos orgánicos que se encuentran regulados por su peligrosidad para el medio ambiente y para la salud humana, debido a su toxicidad, su capacidad de bioacumulación, y su persistencia en el medio ambiente. A pesar de ser persistentes pueden ser degradados dependiendo de las condiciones químicas del medio en el que se encuentren, dando lugar a metabolitos que también pueden presentar efectos tóxicos. Por estos motivos, la legislación es cada vez menos permisiva con las concentraciones máximas admitidas en muestras medioambientales.

El medio marino es un patrimonio muy valioso que tiene que ser protegido, conservado y rehabilitado para que los océanos y mares estén limpios, siendo de este modo sanos y productivos. Por este motivo, se han establecido una serie de medidas destinadas a la reducción del impacto sobre el medio marino y al uso sostenible de sus bienes y servicios, con el objetivo de mantener un buen estado medioambiental en el medio marino evitando así un nuevo deterioro (Directiva Marco sobre la Estrategia Marina).

Por ello, el objetivo de este trabajo es el desarrollo de metodología analítica para la determinación de nueve triazinas y ocho de sus metabolitos en dos compartimentos del medio marino: agua y sedimentos, comprendiendo las siguientes etapas:

- Validación de un método de cromatografía de líquidos con detección por espectrometría de masas en tándem (LC/MS-MS), que proporcione adecuada selectividad, sensibilidad, precisión y linealidad para la determinación de los compuestos objeto de estudio.
- Validación de un método de extracción de triazinas y sus productos de degradación en agua de mar mediante extracción en fase sólida
- Validación de un método de dispersión de la matriz en fase sólida para la extracción de triazinas y sus productos de degradación en sedimentos marinos.

3. Antecedentes

El uso de sustancias contaminantes, entre las que se encuentran los herbicidas triazínicos, se ha visto incrementado en los últimos años debido a las diversas demandas de la sociedad actual. Estas sustancias se acumulan en una gran variedad de matrices en las que los niveles de concentración permitidos por las diferentes legislaciones son cada vez menores, llegando a niveles traza de concentración. Por ello, en los últimos años se han desarrollado nuevos métodos de extracción para la determinación de contaminantes en matrices complejas.

Las triazinas y sus productos de degradación se distribuyen en el medioambiente alcanzando el ecosistema marino, constituyendo un peligro para el propio medioambiente y para la salud de las personas. Además, cabe destacar que la conservación y el uso sostenible del medio marino constituyen factores importantes para la prosperidad económica, de especial relevancia en Galicia con 1700 Km de costa, y donde la comercialización de los productos del mar y derivados es una fuente importante de su economía. Este trabajo se centrará en dos compartimentos del medio marino: agua y sedimentos.

3.1. Agua de mar

El método clásico de extracción de triazinas y sus metabolitos en aguas es la extracción líquido-líquido (LLE) (Retamal et al., 2013). Los principales inconvenientes de este método de extracción son el elevado consumo de disolvente, un tiempo largo de extracción y la necesidad de una etapa de limpieza posterior con el fin de eliminar posibles sustancias interferentes.

Como alternativa a la extracción líquido-líquido, se han desarrollado nuevos procedimientos analíticos entre los que se encuentran la extracción en fase sólida (SPE) (Carabias-Martínez et al., 2002; Van Pinxteren et al., 2009; Benvenuto et al., 2010; Rodríguez-González et al., 2013; Akdogan et al., 2015). Esta técnica consiste en preconcentrar y aislar los analitos sobre un soporte sólido eluyendo posteriormente los compuestos de interés con una cantidad relativamente baja de disolvente; además presenta tiempos de extracción más cortos que la LLE. Posteriormente, con objeto de minimizar el consumo de disolventes orgánicos de acuerdo a los principios de la Química Verde, se han desarrollado otras técnicas como la extracción con barra de agitación magnética (SBSE) (Sánchez-Ortega et al., 2009), la microextracción en fase sólida (SPME) (Mohammadi et al., 2009), la microextracción en fase líquida (LPME) (Tric-Petrovic et al., 2010) la microextracción líquido-líquido-sólido (LLSME) (Hu et al.,

2009) y la microextracción dispersiva líquido-líquido (DLLME) (Zhou et al., 2009; Wang et al., 2010 ; Sanagi et al., 2012). Sin embargo, algunas de estas nuevas técnicas presentan una serie de desventajas como baja sensibilidad y eficiencia, siendo algunas de ellas muy laboriosas. Por ello, la extracción en fase sólida es la técnica de extracción más comúnmente empleada para la determinación de triazinas y sus productos de degradación en muestras acuosas (Rodríguez-González et al., 2013).

Los adsorbentes más empleados para la preconcentración de triazinas en aguas mediante SPE son de naturaleza de fase reversa, como octadecil-silano (C18) que fue uno de los primeros adsorbentes empleados (Akdogan et al., 2013). Actualmente existe una gran variedad de adsorbentes para SPE pero los más utilizados son los adsorbentes comerciales hidrofílicos obtenidos por copolimerización como el Oasis HLB, que es un polímero macroporoso poli(N-vinilpirrolidina-DVB) (PVP-DVB). Este adsorbente es muy utilizado por sus ventajas, entre las que se encuentra la posibilidad de extraer compuestos polares y apolares, limpieza de matrices complejas, elevada capacidad y eficacia a la hora de eliminar posibles interferencias (Gilart et al., 2014). Otros adsorbentes poliméricos hidrofílicos utilizados en SPE son Bond Elut Plexa o Strata-X (Gilart et al., 2014). Recientemente se han probado como adsorbente las nanofibras de Nylon 6/ polipirrol (Yang et al., 2015) y el grafeno (Wu et al., 2015).

Para la extracción en fase sólida de triazinas y sus principales productos de degradación se han empleado diferentes adsorbentes tales como Oasis MCX (Papadopoulos et al., 2007; Li et al., 2013), PLRP-s (Postigo et al., 2010; Hurtado-Sánchez et al., 2013), Oasis HLB (Huff and Foster, 2011; Hurtado-Sánchez et al., 2013), Amberlite XAD-4 (Akdogan et al., 2013) y Oasis MAX (Zhang et al., 2014). Sin embargo, el adsorbente que ha mostrado una mejor capacidad para retener tanto las triazinas como algunos de los productos de degradación más polares frente a otros adsorbentes es el Oasis HLB (Gervais et al., 2008; Benvenuto et al., 2010).

En relación a los eluyentes, los disolventes más utilizados para realizar la elución de las triazinas en aguas se encuentran la acetona (Rodríguez-González et al., 2013), metanol (Akdogan et al., 2013), mezcla de acetonitrilo:agua (1:1) (Van Pinxteren et al., 2009), y combinación de metanol:acetato de etilo (1:1) (Carabias-Martínez et al., 2002).

3.2. Sedimentos marinos

Las metodologías más frecuentemente utilizadas para la determinación de triazinas y/o sus productos de degradación en sedimentos emplean la extracción con disolventes. Estos procedimientos usan técnicas tales como la extracción Soxhlet (Galanopoulou et al., 2005), la agitación mecánica (Li et al., 2010; Papadopoulos et al., 2012), la extracción con ultrasonidos (Hela et al., 2005; Nödler et al., 2013), la extracción con energía de microondas (MAE) (Fernández et al., 2013; Kalogridi et al., 2014) y la extracción con líquidos presurizados (PLE) (Devault et al., 2010; Camino-Sánchez et al., 2011). Estas técnicas frecuentemente necesitan un proceso de limpieza adicional para eliminar la presencia de sustancias interferentes en el extracto final que pueden afectar a los límites de detección de los métodos o conducir a un resultado erróneo en la determinación cromatográfica. Además las técnicas clásicas de extracción sólido-líquido consumen una gran cantidad de disolventes y presentan largos tiempos de extracción.

Debido a la amplia gama de las propiedades químicas de los herbicidas, entre las que se incluyen la acidez, y a la gran variedad de matrices en las que éstos se encuentran, en los últimos años se han desarrollado nuevos métodos de determinación de contaminantes en matrices complejas, que permiten realizar un análisis más rápido, ya que permiten reducir las etapas de purificación y concentración, evitan el uso de grandes volúmenes de disolventes orgánicos y mejoran los límites de detección. En este contexto, técnicas como SBSE (Camino-Sánchez et al., 2011) y QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) (Brondi et al., 2011; Masiá et al., 2013) han sido aplicadas al análisis de triazinas en sedimentos. Otra técnica reciente es la dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD), que ha mostrado ser adecuada para la determinación de residuos de contaminantes como antibióticos y absorbentes UV en sedimentos (Sánchez-Brunete et al., 2010; González-Mariño et al., 2010); sin embargo en la bibliografía no se recogen aplicaciones de esta técnica a la determinación de pesticidas en sedimentos.

MSPD es un procedimiento de extracción que combina aspectos de diferentes técnicas analíticas permitiendo la homogenización, extracción, fraccionamiento, limpieza y preconcentración de la muestra en un único procedimiento (Barker et al., 2000.) La eficacia de MSPD depende del agente dispersante y de los disolventes utilizados. Además, su eficiencia puede verse afectada por las características de los co-adsorbentes empleados en la limpieza del extracto.

La mayoría de los procedimientos de MSPD empleados para la extracción de muestras medioambientales utilizan dispersantes en fase reversa, especialmente C18 (Sánchez-Brunete et al., 2010; Pérez et al., 2012) y de naturaleza inerte como la tierra de diatomeas (González-Mariño et al., 2010; Carpinteiro et al., 2012). En ambos casos se emplea adicionalmente un adsorbente en fase normal como sílica, florisil o alúmina para mejorar la limpieza del extracto. Los materiales basados en carbón han sido menos empleados como dispersantes; estos materiales presentan una estructura no porosa y una gran área superficial permitiendo un rápido procesado de las muestras; además presentan una gran afinidad por compuestos orgánicos tanto polares como apolares. Así, estudios recientes empleando carbón como agente dispersante han proporcionado resultados altamente satisfactorios, no siendo además necesario el uso de un co-adsorbente adicional en la limpieza del extracto (Li et al., 2011).

Con respecto a los eluyentes, los disolventes más utilizados en MSPD para la elución de triazinas en muestras biológicas son el diclorometano (Tseng et al., 2004), el acetonitrilo (Souza-Caldas et al., 2013), el acetato de etilo (Wen et al., 2012), así como una mezcla de estos dos últimos disolventes (Rodríguez-González et al., 2014). En los últimos años el uso de diclorometano ha disminuido considerablemente, de acuerdo a los principios de la Química Verde, por tratarse de un disolvente clorado.

Debido a las ventajas que ofrece la MSPD, esta técnica ha sido ampliamente empleada en la extracción de residuos de diferentes contaminantes en tejidos, tanto de origen vegetal como animal. No obstante, las aplicaciones de MSPD a muestras sólidas medioambientales como suelos o sedimentos son muy escasas y recientes, y en lo que respecta a los herbicidas triazínicos, no se encuentran referencias en la literatura empleando esta técnica de extracción en sedimentos.

4. Procedimiento experimental

4.1 Materiales y equipos

- Balanza analítica, precisión 0.0001 g AND, modelo ER-180.
- Bomba de vacío y presión Millipore modelo WP6122050.
- Filtros de politetrafluoroetileno (PTFE) de tamaño de poro 0.2 μm .
- Material de uso común del laboratorio.
- Micropipetas Eppendorf de 10-100 μL , 20-200 μL , 100-1000 μL y 500-5000 μL .
- Mortero y maza de vidrio.
- Rotavapor. Büchi, modelo R-3000.
- Sistema distribuidor de vacío Visiprep Supelco.
- Ultrasonidos J.P. Selecta, modelo ultrasonidos-H.
- Sistema de cromatografía líquida Agilent HP-1200 equipado con:
 - Automuestreador
 - Bomba binaria
 - Horno termostático
 - Columna Hypersil GOLD C18 (150 x 4.6 mm, 5 μm)
- Detector de espectrometría de masas de triple cuadrupolo API 3200 equipado con una fuente APCI/ESI.

4.2 Reactivos

- Acetato de etilo para análisis instrumental. Panreac.
- Acetonitrilo, calidad gradiente HPLC. Merck.
- Agua milli-Q (resistividad específica = 18M Ω /cm). Millipore
- Cartuchos Oasis HLB. Waters.
- Detergente alcalino sólido DERQUIM LA 13. Panreac.
- Jeringa para SPE de vidrio (6 mL) con frita de polietileno de 20 μm .
- Metanol 205, calidad gradiente HPLC. Merck.
- Patrones individuales de 100 mg/L de: ametrina, atrazina, cianazina, desetilatrizina (DEA), desetilterbutilazina (DET), desisopropilatrizina (DIA), prometrina, propazina, simetrina, simazina, terbutrina y terbutilazina. Patrones individuales de 50 mg/L de: desetildesisopropilatrizina (DEDIA), desetil-2-hidroxiatrizina (DEHA), desisopropil-2-hidroxiatrizina (DIHA), 2-hidroxiatrizina (HA) y 2-hidroxiterbutilazina (HT).
- Supelclean ENVI-Carb. Sigma Aldrich.

4.3 Preparación de disoluciones patrón.

- Disoluciones patrón empleadas en la validación del método instrumental.

A partir de las disoluciones individuales de 100 y 50 mg/L de las triazinas y los productos de degradación, las cuales están almacenadas a 18°C, se prepara en metanol una disolución patrón con una concentración de 1 mg/L para todos los compuestos.

- Disoluciones patrón empleadas para los métodos de extracción.

A partir de las disoluciones individuales de 100 y 50 mg/L de las triazinas y los productos de degradación, se preparan en metanol dos disoluciones patrón (Mix I y Mix II) con una concentración de 1 mg/L. La disolución Mix I contiene los compuestos que presentan mayor sensibilidad (Ametrina, Atrazina, Cianazina, DEA, DET, DIA, HA, HT, Prometrina, Propazina, Simetrina, Simazina, Terbutrina y Terbutilazina) y la disolución Mix II contiene aquellos que presentan menor sensibilidad (DEDIA, DEHA y DIHA).

Todas las disoluciones de trabajo se preparan diariamente partiendo de las disoluciones patrón diluyendo en metanol las cantidades correspondientes.

4.4 Método de extracción

4.4.1 Agua de mar

Para las muestras de agua de mar el método de extracción utilizado es la extracción en fase sólida (SPE) empleando cartuchos desechables Oasis HLB conectados a un sistema de vacío. Este método se basa en un estudio previo desarrollado en el Departamento de Química Analítica para el análisis de nueve triazinas en agua de mar (Rodríguez-González et al, 2013), que se modificó ligeramente para poder llevar a cabo la aplicación a las nueve triazinas y a ocho de sus principales productos de degradación.

El procedimiento de extracción consiste en pasar 10 mL de muestra a través del cartucho, previamente acondicionado con 10 mL de metanol y 10 mL de agua milli-Q. Una vez cargada la muestra se realiza un lavado con 5 mL de agua milli-Q. Después del lavado, es importante secar los cartuchos, de este modo se favorece el contacto entre el eluyente y los analitos retenidos y se elimina el agua evitando que se arrastre en la elución. Los cartuchos se secan durante 30 minutos en corriente de nitrógeno y se lleva a cabo la elución con 2.5 mL de metanol. Finalmente, el eluato se trasvasa a una jeringa y se filtra a través de un filtro PTFE 0.2 µm al interior de un vial para su análisis cromatográfico. En la **figura 4.1** se ilustra el procedimiento de extracción.

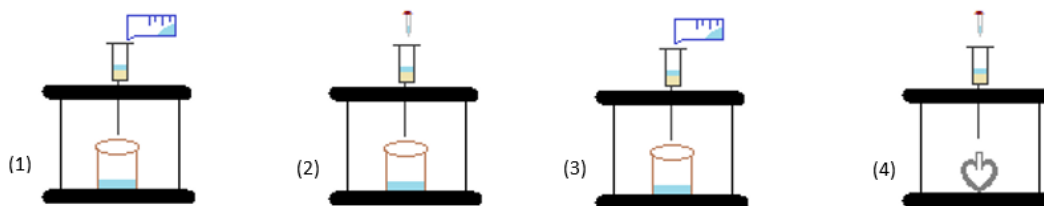


Figura 4.1. Proceso de extracción mediante SPE: (1) Acondicionamiento del cartucho, (2) Carga de muestra, (3) Lavado con 5 mL de agua, (4) Elución con 2.5 mL de metanol

4.4.2 Sedimentos marinos

En el caso de los sedimentos, el método de extracción empleado es la dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD) siguiendo un procedimiento desarrollado en el Departamento de Química Analítica para el análisis de nueve triazinas en sedimentos (Rodríguez-González et al, 2016). Este método, que emplea ENVI-Carb como agente dispersante, se modificó ligeramente con respecto al eluyente con el fin de poder aplicarlo además a ocho de los principales productos de degradación de las triazinas.

Antes de llevar a cabo el proceso de extracción, es necesario realizar un lavado previo del agente dispersante con el fin de eliminar las sustancias interferentes que pueda tener y que puedan afectar al posterior análisis. Para ello, ENVI-Carb se lava durante una hora con acetato de etilo y durante otra hora con acetonitrilo. Finalmente se seca 24 horas en una estufa a 50°C y se guarda en un frasco de vidrio ámbar en un desecador.

El procedimiento de extracción utilizado consiste en homogeneizar 1.0000 g de sedimento liofilizado con 1.00 g de ENVI-Carb en un mortero de vidrio. Esta mezcla se trasvasa a una jeringa de vidrio de 6 mL con frita de polietileno de 20 µm y a continuación los analitos son eluidos con 20 mL de acetato de etilo y 5 mL de acetonitrilo. En la **figura 4.2** se ilustra el proceso de extracción empleado.

El eluato obtenido, se evapora hasta la gota en el rotavapor y se lleva a sequedad en corriente de nitrógeno. Finalmente, se redissuelve en 1 mL de metanol y se filtra a través de un filtro PTFE 0.2 µm al interior de un vial para su análisis cromatográfico.

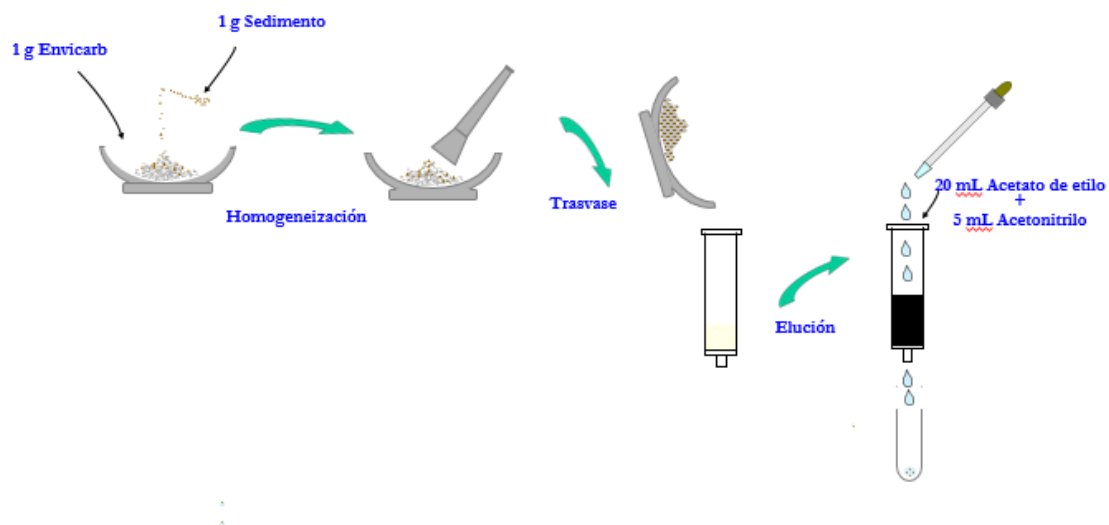


Figura 4.2. Proceso de extracción mediante MSPD

4.5 Lavado de material

Es importante que el material esté lavado correctamente para evitar cualquier fuente de contaminación que pueda producirse durante el procedimiento, ya que se está trabajando con compuestos orgánicos a niveles traza ($\mu\text{g/L}$). Por este motivo, el material de vidrio utilizado se somete a un protocolo de limpieza que consiste en enjuagar con agua y sumergirlo en una disolución acuosa de un detergente alcalino durante 48 horas. Si no se dispone de material lavado, éste debe estar como mínimo 1 hora en jabón alcalino en un baño de ultrasonidos. Por último, se aclara con agua del grifo y con agua milli-Q.

4.6 Método cromatografía líquida-espectrometría masas/masas

El método de cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem empleado para la determinación de las triazinas y sus productos de degradación se optimizó previamente en el Departamento de Química Analítica da Universidade da Coruña.

En dicho estudio, se seleccionaron tanto el voltaje de cono como la energía de colisión óptima para obtener el ion precursor y las transiciones de cada uno de los pesticidas. Para la cuantificación se seleccionó la transición más sensible, mientras que la otra transición fue utilizada para la confirmación. Además, para cada uno de los analitos se

estudió la ionización en modo positivo y negativo, escogiéndose el modo positivo para el análisis de todos los compuestos. Los parámetros optimizados para cada pesticida se muestran en la **tabla 4.1**.

Tabla 4.1. Tiempos de retención y parámetros MS/MS para los compuestos estudiados

Compuesto	Rt (min)	Ion precursor (m/z)	Ion producto (m/z)	Cono (V)	Energía colisión (eV)
DIHA	1.72	156	70	11.000	37.000
			86	11.000	25.000
DEHA	1.87	170	128	2.500	23.000
			86	2.500	31.000
HA	2.23	198	69	5.500	43.000
			151	5.500	23.000
DEDIA	2.23	146	68	7.500	31.000
			62	7.500	49.000
HT	2.51	212	156	5.500	19.000
			70	5.500	49.000
DIA	2.72	174	68	9.000	37.000
			104	9.000	33.000
DEA	3.73	188	146	12.000	25.000
			104	12.000	31.000
Simetrina	5.32	214	68	6.000	47.000
			124	6.000	29.000
Simazina	6.81	202	104	4.500	33.000
			68	4.500	45.000
Cianazina	7.55	241	214	6.000	21.000
			68	6.000	53.000
DET	8.16	202	146	5.000	19.000
			104	5.000	35.000
Ametrina	8.47	228	186	8.000	23.000
			68	8.000	51.000
Atrazina	10.81	216	174	6.500	23.000
			68	6.500	49.000
Prometrina	12.43	242	158	4.000	33.000
			68	4.000	51.000
Terbutrina	12.51	242	186	4.500	25.000
			68	4.500	55.000
Propazina	14.67	230	146	11.000	33.000
			58	11.000	37.000
Terbutilazina	15.79	230	174	4.500	21.000
			68	4.500	49.000

Se optimizó la separación cromatográfica, estudiando tanto la composición de la fase móvil empleada como el gradiente de elución, obteniéndose la mejor separación de los picos cromatográficos cuando se emplean como fases móviles acetonitrilo y disolución acuosa de ácido acético al 0.3% y el gradiente de elución que se muestra en la **tabla 4.2**. El flujo de la fase de móvil es 1 mL/min y el volumen de inyección de 20 µL. Con estas condiciones todos los analitos se separaron en un tiempo de 23 minutos.

Proceso experimental

Tabla 4.2. Gradiente utilizado para la separación de las triazinas y sus productos de degradación

Tiempo (min)	Acetonitrilo (%)	Ácido acético 0.3% (ac) (%)
0	30	70
2	30	70
15	50	50
23	30	70

5. Resultados y discusión

5.1 Validación del método instrumental

5.1.1 Calibrado

Las curvas de calibrado se obtienen a partir de ocho disoluciones patrón con unas concentraciones de 0.25, 0.50, 0.75, 1.0, 1.25, 1.5, 2.0 y 2.5 µg/L. Cada nivel de concentración se prepara diluyendo en metanol la cantidad necesaria de una mezcla de todos los compuestos de interés de 10 µg/L. Se realizan 3 inyecciones por concentración en las condiciones cromatográficas optimizadas. Con los datos obtenidos, se representan las áreas de cada analito frente a la concentración y se hace un ajuste lineal de mínimos cuadrados.

Tabla 5.1. Rectas de calibrado del método instrumental

Compuesto	Coefficiente determinación	^a Intervalo intersección	^a Intervalo pendiente	^a CV pendiente (%)
DIHA	0.9923	566 ± 0.1	4610 ± 0.1	2.7·10 ⁻³
DEHA	0.9961	-527 ± 0.1	18234 ± 0.1	4.8·10 ⁻⁴
HA	0.9932	318 ± 0.1	12454 ± 0.1	9.2·10 ⁻⁴
DEDIA	0.9957	140 ± 0.1	1913 ± 0.1	4.0·10 ⁻³
HT	0.9944	7580 ± 0.1	41166 ± 0.1	2.5·10 ⁻⁴
DIA	0.9927	-202 ± 0.1	4419 ± 0.1	2.7·10 ⁻³
DEA	0.9955	1118 ± 0.1	16551 ± 0.1	5.7·10 ⁻⁴
Simetrina	0.9962	832 ± 0.1	29585 ± 0.1	2.9·10 ⁻⁴
Simazina	0.9916	1087 ± 0.1	13926 ± 0.1	9.2·10 ⁻⁴
Cianazina	0.9939	-2159 ± 0.1	16801 ± 0.1	6.4·10 ⁻⁴
DET	0.9917	-1677 ± 0.1	18587 ± 0.1	6.8·10 ⁻⁴
Ametrina	0.9947	-7306 ± 0.1	59512 ± 0.1	1.4·10 ⁻⁴
Atrazina	0.9943	1547 ± 0.1	22526 ± 0.1	4.7·10 ⁻⁴
Prometrina	0.9993	-8080 ± 0.04	87863 ± 0.04	4.3·10 ⁻⁵
Terbutrina	0.9915	-14827 ± 0.1	156240 ± 0.1	8.2·10 ⁻⁵
Propazina	0.9943	-2043 ± 0.1	23000 ± 0.1	4.6·10 ⁻⁴
Terbutilazina	0.9976	-3820 ± 0.1	51851 ± 0.1	1.3·10 ⁻⁴

^a Nivel de confianza 95%

En la **tabla 5.1** se muestran los parámetros obtenidos para las rectas de calibrado de las diferentes triazinas y sus productos de degradación. Los resultados muestran que todos los compuestos presentan una buena linealidad en el rango estudiado, con coeficientes de determinación superiores a 0.99.

5.1.2 Límites de detección y cuantificación

El límite de detección (LOD) es la mínima concentración o masa de analito que genera una señal que no puede ser confundida con la de un blanco. El límite de cuantificación (LOQ) es la mínima concentración o masa de analito que genera una señal que no puede ser confundida con la de un blanco y que puede ser cuantificada de forma fiable.

Estos límites son calculados a partir de los parámetros de la recta obtenida en el calibrado. Las expresiones utilizadas son las siguientes:

$$\text{LOD} = \frac{3 \cdot S_{y/x}}{b} \quad \text{LOQ} = \frac{10 \cdot S_{y/x}}{b}$$

$S_{y/x}$ = error promedio del ajuste de la recta de calibrado

b = pendiente de la recta de calibrado

Los límites instrumentales, calculados según las fórmulas descritas anteriormente, se muestran en la **tabla 5.2**.

5.1.3 Precisión instrumental

La precisión es una medida del error aleatorio y se define como el grado de concordancia entre los datos que se obtienen de la misma forma, expresándose como desviación relativa standard (RSD). La precisión es buena cuando la dispersión de los datos evaluados es pequeña. El estudio de la precisión del método cromatográfico se realiza evaluando la repetibilidad y la reproducibilidad.

La repetibilidad de una medida es el grado de concordancia entre dos o más valores correspondientes a la misma muestra, ejecutados por el mismo instrumento y operador en un mismo laboratorio y en un periodo de tiempo corto. La repetibilidad se estudió a dos niveles de concentración (1 y 2 $\mu\text{g/L}$), inyectando 10 réplicas de cada una de las disoluciones patrón el mismo día. Como puede verse en la **tabla 5.3** los valores fueron satisfactorios para todos los compuestos (RSD menores que 2.00% para el nivel más alto de concentración y menores que 2.03% para el nivel más bajo).

Tabla 5.2. Límites de detección y cuantificación instrumentales

Compuesto	LOD ($\mu\text{g/L}$)	LOQ ($\mu\text{g/L}$)
DIHA	0.15	0.46
DEHA	0.11	0.33
HA	0.14	0.43
DEDIA	0.25	0.75
HT	0.13	0.39
DIA	0.15	0.45
DEA	0.12	0.35
Simetrina	0.20	0.61
Simazina	0.16	0.48
Cianazina	0.13	0.41
DET	0.16	0.48
Ametrina	0.16	0.48
Atrazina	0.13	0.40
Prometrina	0.05	0.14
Terbutrina	0.16	0.48
Propazina	0.13	0.40
Terbutilazina	0.08	0.26

La reproducibilidad (precisión inter-día) es el grado de concordancia entre dos o más valores correspondientes a una misma muestra, pero de alícuotas diferentes sometidas al mismo tratamiento y ejecutados a lo largo de un período de tiempo. La reproducibilidad se evaluó también a dos niveles de concentración (1 y 2 $\mu\text{g/L}$), se prepararon cinco réplicas de cada uno de los patrones a lo largo de tres días consecutivos. Los valores obtenidos (ver **tabla 5.3**) indican que el método es reproducible.

Tabla 5.3. Repetibilidad y reproducibilidad instrumentales expresadas en % RSD

Compuesto	Repetibilidad	Repetibilidad	Reproducibilidad	Reproducibilidad
	RSD (%) 1 µg/L	RSD (%) 2 µg/L	RSD (%) 1 µg/L	RSD (%) 2 µg/L
DIHA	1.37	0.77	0.57	0.51
DEHA	1.21	0.57	5.51	6.10
HA	0.27	1.29	0.41	0.38
DEDIA	0.96	0.35	0.05	0.04
HT	0.72	0.08	2.77	1.57
DIA	0.45	1.68	0.14	0.46
DEA	2.03	0.87	0.28	0.81
Simetrina	0.73	0.39	4.65	0.10
Simazina	1.39	0.91	1.99	5.17
Cianazina	0.71	0.75	7.60	6.58
DET	1.03	0.63	5.80	0.40
Ametrina	0.35	2.00	0.64	1.51
Atrazina	0.61	0.20	0.13	0.42
Prometrina	0.30	1.28	2.43	2.76
Terbutrina	1.18	0.90	4.31	5.40
Propazina	0.64	0.40	5.44	5.81
Terbutilazina	0.61	0.25	2.71	3.43

5.2 Determinación de triazinas en agua de mar

5.2.1 Método de extracción

El método de extracción utilizado se basa en un estudio previo desarrollado en el departamento de Química Analítica de la Universidad de Coruña (Rodríguez-González et al, 2013). En este trabajo, el método de extracción es necesario, fundamentalmente, para separar los analitos de la matriz salina y no para la concentración del extracto, pues la detección de los compuestos de interés se realiza empleando un detector de espectrometría de masas en lugar de detector de red de diodos (DAD). Teniendo en cuenta que en este trabajo, además de las nueve triazinas determinadas en el método previo se analizan ocho de sus principales productos de degradación, ha sido necesario modificar ligeramente el método desarrollado inicialmente.

El volumen de muestra empleado se redujo de 25 mL a 10 mL, ya que el detector de masas tiene una sensibilidad mayor que el DAD y al emplear menor volumen de muestra se reducen los posibles efectos de matriz. Por otra parte, también se modificó el volumen de agua milli-Q utilizada para el lavado del cartucho una vez cargada la muestra, empleándose 5 mL en lugar de 20 mL. Esta modificación se realizó para evitar pérdidas de los productos de degradación más polares.

Para evitar la etapa de concentración del eluato en el rotavapor y de este modo simplificar el método de extracción evitando a su vez posibles pérdidas de los analitos, se decidió modificar tanto el eluyente empleado como el volumen de elución. Para ello, se han tenido en cuenta los resultados obtenidos por Beceiro-González et al. (2014). En este trabajo se observó que para los disolventes estudiados (acetona, acetonitrilo y metanol) con un volumen de elución de 3 mL se conseguían valores de recuperación satisfactorios para las nueve triazinas estudiadas. Debido que en el caso del acetonitrilo se obtenían unos valores más altos de desviación estándar que para los otros dos eluyentes, se decidió emplear metanol. A continuación, se realizó el método de extracción empleando un patrón de 1 µg/L de todos los compuestos estudiados y volúmenes de elución de 2.5 y 3 mL. Los resultados de las áreas de los picos cromatográficos obtenidos fueron similares empleando ambos volúmenes para todos los compuestos estudiados con RSD < 10%. Por ello, para obtener un factor de preconcentración de 4, se eligió 2.5 mL como volumen de elución.

5.2.2 Validación

5.2.2.1 Calibrado

Se realiza un calibrado preparando seis disoluciones patrón con unas concentraciones de 0.025, 0.050, 0.075, 0.1, 0.25 y 0.5 µg/L para Ametrina, Atrazina, Cianazina, DEA, DET, DIA, HA, HT, Prometrina, Propazina, Simetrina, Simazina, Terbutrina y Terbutilazina y 0.25, 0.50, 0.75, 1.0, 1.5 y 2.0 µg/L para DEDIA, DEHA y DIHA. Cada nivel de concentración se prepara diluyendo en agua milli-Q la cantidad necesaria de una mezcla Mix I o Mix II de 10 µg/L de concentración y se someten al proceso de extracción en fase sólida.

Resultados y discusión

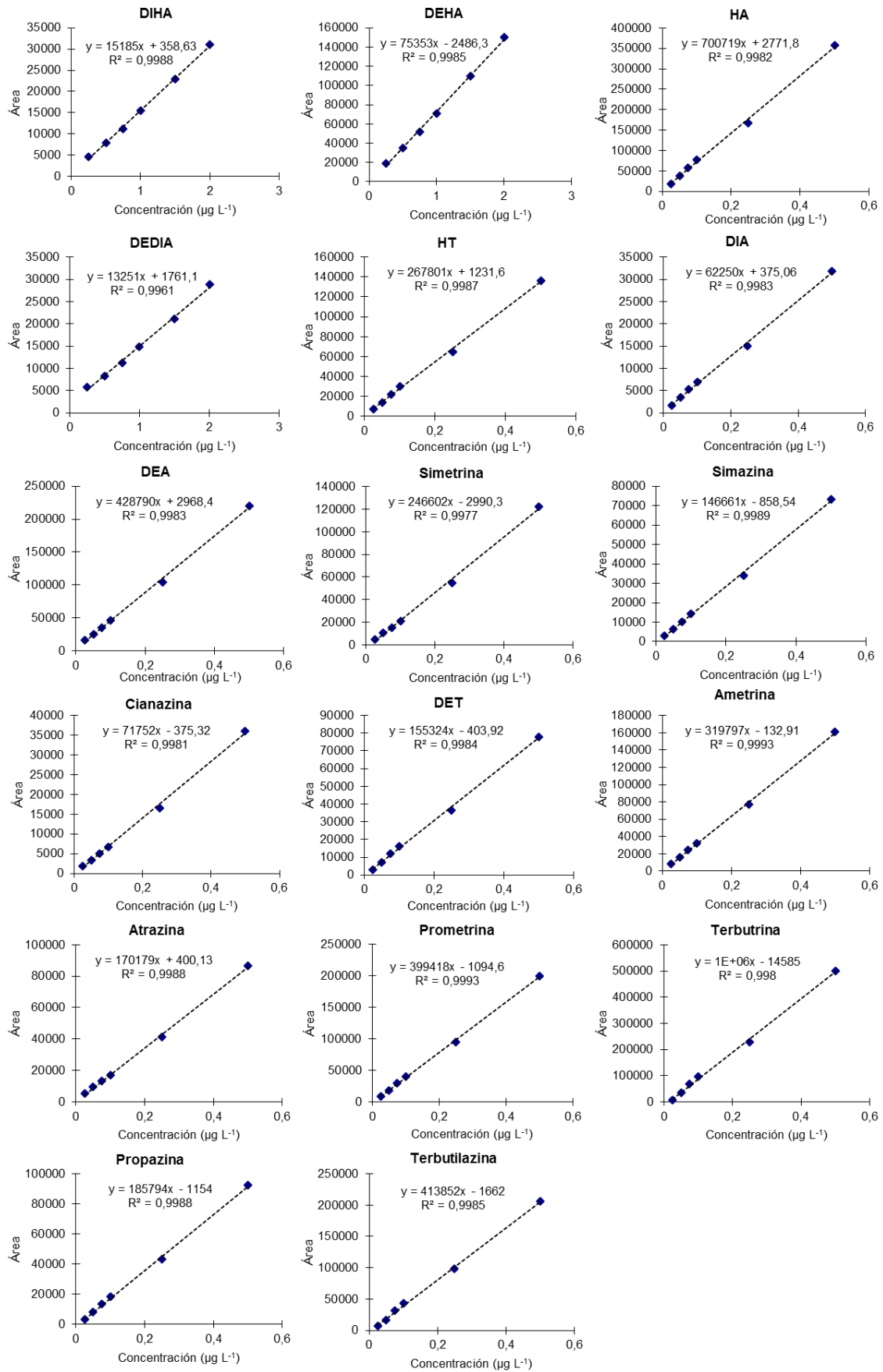


Figura 5.1. Rectas de calibrado del método SPE

Se realizan 3 inyecciones por cada nivel de concentración en las condiciones cromatográficas optimizadas. Con los datos obtenidos se representan las áreas de cada analito frente a la concentración y se hace un ajuste lineal de mínimos cuadrados. En la **figura 5.1** se muestran las rectas de calibrado obtenidas para las diferentes triazinas y sus productos de degradación. Los resultados muestran que todos los compuestos presentan una buena linealidad en el rango estudiado, con coeficientes de determinación superiores a 0.996.

5.2.2.2 Límites de detección y cuantificación

Los límites de detección y de cuantificación se calcularon a partir de la recta de calibrado utilizando las expresiones de la sección 5.1.2. Como se puede observar en la **tabla 5.4**, los LODs y LOQs son satisfactorios para todas las triazinas estudiadas con valores comprendidos entre 0.02 y 0.15 µg/L y 0.05 y 0.45 µg/L respectivamente.

Tabla 5.4. Límites de detección y cuantificación del método SPE

Compuesto	LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)
DIHA	0.08	0.26
DEHA	0.09	0.29
HA	0.03	0.08
DEDIA	0.15	0.45
HT	0.02	0.07
DIA	0.03	0.08
DEA	0.03	0.08
Simetrina	0.03	0.10
Simazina	0.02	0.07
Cianazina	0.03	0.09
DET	0.03	0.08
Ametrina	0.02	0.05
Atrazina	0.02	0.07
Prometrina	0.02	0.05
Terbutrina	0.03	0.09
Propazina	0.02	0.07
Terbutilazina	0.03	0.08

Los valores de los LOQs para todos los compuestos estudiados, excepto DEDIA, DEHA y DIHA, están por debajo del 30% del valor paramétrico más restrictivo que establece la legislación para las triazinas en aguas superficiales (0.34 µg/L para terbutrin). En el caso de los productos de degradación DEDIA, DEHA y DIHA, sus LOQs están por debajo del 30% del valor paramétrico de la atrazina (2 µg/L)

5.2.2.3 Precisión

El estudio de precisión del método de extracción en fase sólida se evalúa mediante la repetibilidad y la reproducibilidad. La repetibilidad se estudió a dos niveles de concentración, uno de los niveles próximo a los LOQs de los compuestos y el otro nivel de concentración cinco veces mayor que el anterior. Para ello, cinco alícuotas de 10 mL de agua de mar se sobrecargan cada una de ellas a uno de los niveles de concentración y otras cinco alícuotas se sobrecargan al otro nivel. Los niveles de concentraciones empleados fueron 0.05 y 0.25 µg/L para Ametrina, Atrazina, Cianazina, DEA, DET, DIA, HA, HT, Prometrina, Propazina, Simetrina, Simazina, Terbutrina y Terbutilazina y 0.25 y 1.25 µg/L para DEDIA, DEHA y DIHA. Las alícuotas de cada nivel de concentración se inyectan por duplicado en el cromatógrafo. Como puede verse en la **tabla 5.5** los valores de repetibilidad obtenidos para todos los compuestos estudiados son satisfactorios, con desviaciones relativas estándar comprendidas entre 0.12 y 1.41 % para el nivel más bajo de fortificación y entre el 0.15 y 1.37 % para el nivel más alto.

La reproducibilidad se estudió a un nivel de concentración intermedio de 0.1 µg/L para Ametrina, Atrazina, Cianazina, DEA, DET, DIA, HA, HT, Prometrina, Propazina, Simetrina, Simazina, Terbutrina y Terbutilazina y de 1 µg/L para DEDIA, DEHA y DIHA. Cada día del estudio se emplearon cinco alícuotas de 10 mL de agua de mar fortificadas y el ensayo se realiza en tres días consecutivos. Como puede verse en la **tabla 5.5**, los valores obtenidos indican que el método es reproducible.

5.2.2.4 Exactitud

La exactitud se evalúa en términos de recuperación, analizando alícuotas de agua de mar fortificadas a dos niveles de concentración. Para ello, cinco alícuotas de 10 mL de agua de mar se sobrecargan con 0.05 µg/L para Ametrina, Atrazina, Cianazina, DEA, DET, DIA, HA, HT, Prometrina, Propazina, Simetrina, Simazina, Terbutrina y

Terbutilazina y 0.25 µg/L para DEDIA, DEHA y DIHA y otras cinco alícuotas se sobrecargan con 1.25 µg/L para DEDIA, DEHA y DIHA y 0.25 µg/L para el resto de los compuestos. Los resultados se comparan con patrones de las mismas concentraciones preparados en agua milli-Q y sometidos al mismo proceso de extracción.

Los valores obtenidos para la recuperación de las triazinas y sus productos de degradación (ver **tabla 5.5**) son satisfactorios, ya que oscilan entre 87.5 y 99.1 % para el nivel más bajo de concentración y entre 90.3 y 99.4 % para el nivel más alto.

Tabla 5.5. Estudio de exactitud y precisión del método SPE

Compuesto	Recuperación		Repetibilidad RSD (%)		Reproducibilidad RSD (%)
	Nivel bajo	Nivel alto	Nivel bajo	Nivel alto	
DIHA	91.2	93.7	0.65	0.20	0.23
DEHA	89.0	90.3	0.24	0.36	0.18
HA	89.4	93.1	0.59	0.21	0.05
DEDIA	87.5	91.0	0.38	0.15	0.36
HT	89.4	91.3	0.19	0.41	0.18
DIA	94.4	98.1	0.70	0.15	0.22
DEA	97.4	97.9	0.12	0.29	0.30
Simetrina	98.8	98.6	0.38	0.36	0.94
Simazina	93.5	95.5	0.61	0.57	0.92
Cianazina	97.5	98.1	1.41	0.21	0.02
DET	97.7	96.0	0.81	0.82	0.68
Ametrina	99.1	97.7	0.22	0.54	0.32
Atrazina	92.7	95.3	0.70	1.37	0.20
Prometrina	98.1	98.4	0.33	0.59	0.06
Terbutrina	96.0	99.4	1.13	0.26	0.17
Propazina	98.4	97.9	0.49	0.78	1.06
Terbutilazina	98.7	98.1	0.25	0.80	0.27

En la **figura 5.2** se muestran los cromatogramas de los compuestos correspondientes al primer segmento, por orden de elución, para una muestra de agua de mar al nivel más bajo de sobrecarga.

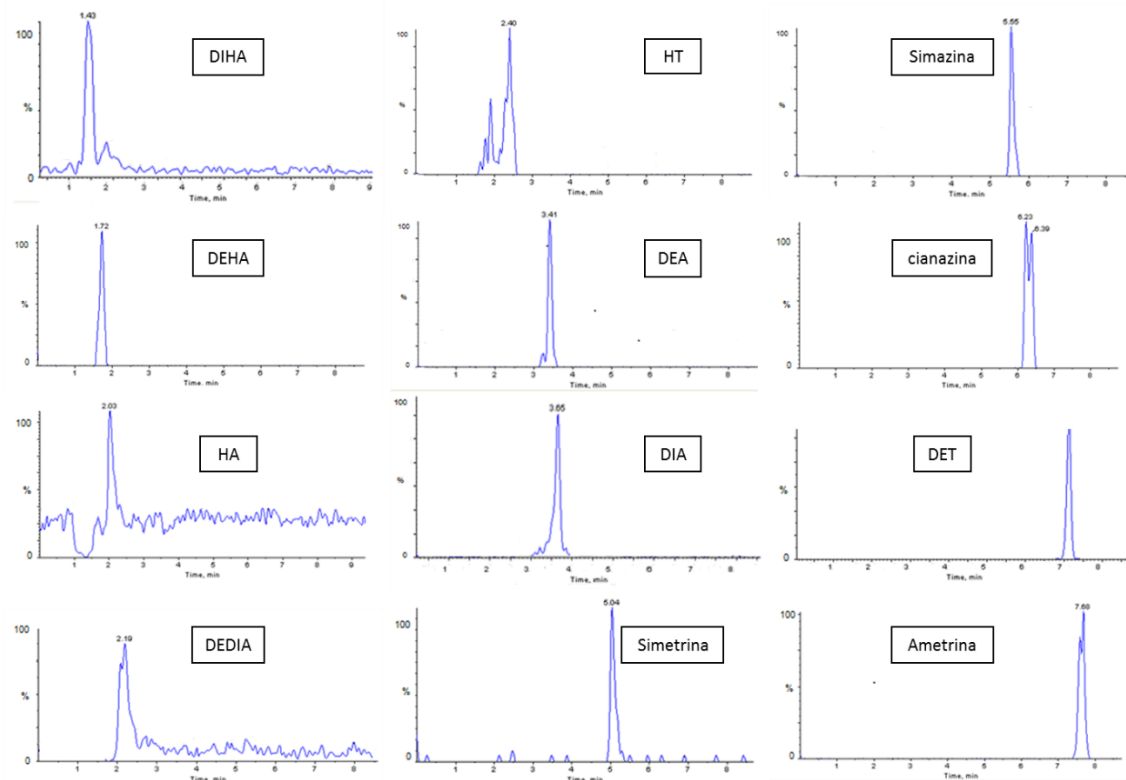


Figura 5.2. Cromatogramas LC-MS/MS de los productos de degradación y las cuatro triazinas del primer segmento para una muestra de agua de mar fortificada

5.3 Determinación de triazinas en sedimentos

5.3.1 Método de extracción

El método de extracción utilizado se basa en un estudio previo desarrollado en el departamento de Química Analítica da Universidade da Coruña (Rodríguez-González et al, 2016). Dado que en este trabajo se realiza además el análisis de ocho productos de degradación de las triazinas, los cuales presentan mayor polaridad que las triazinas, el eluyente se modificó ligeramente, empleándose, además de 20 mL de acetato de etilo del método de partida, 5 mL adicionales de acetonitrilo.

La modificación del volumen y tipo de eluyente se realizó basándose en un estudio previo (Rodríguez-González et al, 2014) para la determinación de triazinas en algas empleando un coadsorbente polar adicional en la etapa de extracción. En este trabajo se optimizó volumen y tipo de eluyentes (acetato de etilo, acetonitrilo y mezclas de ambos disolventes en distintas proporciones) obteniéndose los mejores resultados con la elución secuencial de 20 mL de acetato de etilo y 5 mL de acetonitrilo.

5.3.2 Validación

5.3.2.1 Calibrado

Se realiza un calibrado sobrecargando 1 g de sedimento con unas concentraciones de 0.25, 0.50, 1.0, 1.5, 2.0 y 2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para Ametrina, Atrazina, Cianazina, DEA, DET, DIA, HA, HT, Prometrina, Propazina, Simetrina, Simazina, Terbutrina y Terbutilazina y 2.5, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0 y 25.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para DEDIA, DEHA y DIHA. Cada nivel de concentración se prepara sobrecargando 1 g de sedimento con la cantidad necesaria de una mezcla Mix I y Mix II, de 10 y 100 $\mu\text{g}/\text{L}$ de concentración respectivamente, y se somete al procedimiento de extracción.

Se realizan 3 inyecciones por cada nivel de concentración en las condiciones cromatográficas optimizadas. Con los datos obtenidos se representan las áreas de cada analito frente a la concentración y se hace un ajuste lineal de mínimos cuadrados. En la **figura 5.3** se muestran las rectas de calibrado obtenidas para las diferentes triazinas y sus productos de degradación. Los resultados muestran que todos los compuestos presentan una buena linealidad en el rango estudiado, con coeficientes de determinación superiores a 0.998.

5.3.2.2 Límites de detección y cuantificación

Los límites de detección y de cuantificación se calcularon a partir de la recta de calibrado utilizando las expresiones de la sección 5.1.2. Como se puede observar en la **tabla 5.6**, los LODs y LOQs presentan valores comprendidos entre 0.08 y 1.40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y 0.23 y 4.26 $\mu\text{g}/\text{kg}$ respectivamente. Estos valores son muy satisfactorios ya que aunque no hay legislación para estos compuestos en sedimentos, los valores de LOQs obtenidos para todos los compuestos estudiados, excepto DEDIA, DEHA y DIHA, son 20-40 veces inferiores que el límite máximo más restrictivo establecido por la Legislación para triazinas en algas comestibles (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para simazina). En el caso de DEDIA, DEHA y DIHA, los valores obtenidos son 10-20 veces inferiores que el límite máximo establecido por la Legislación para terbutilazina en algas comestibles (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

Resultados y discusión

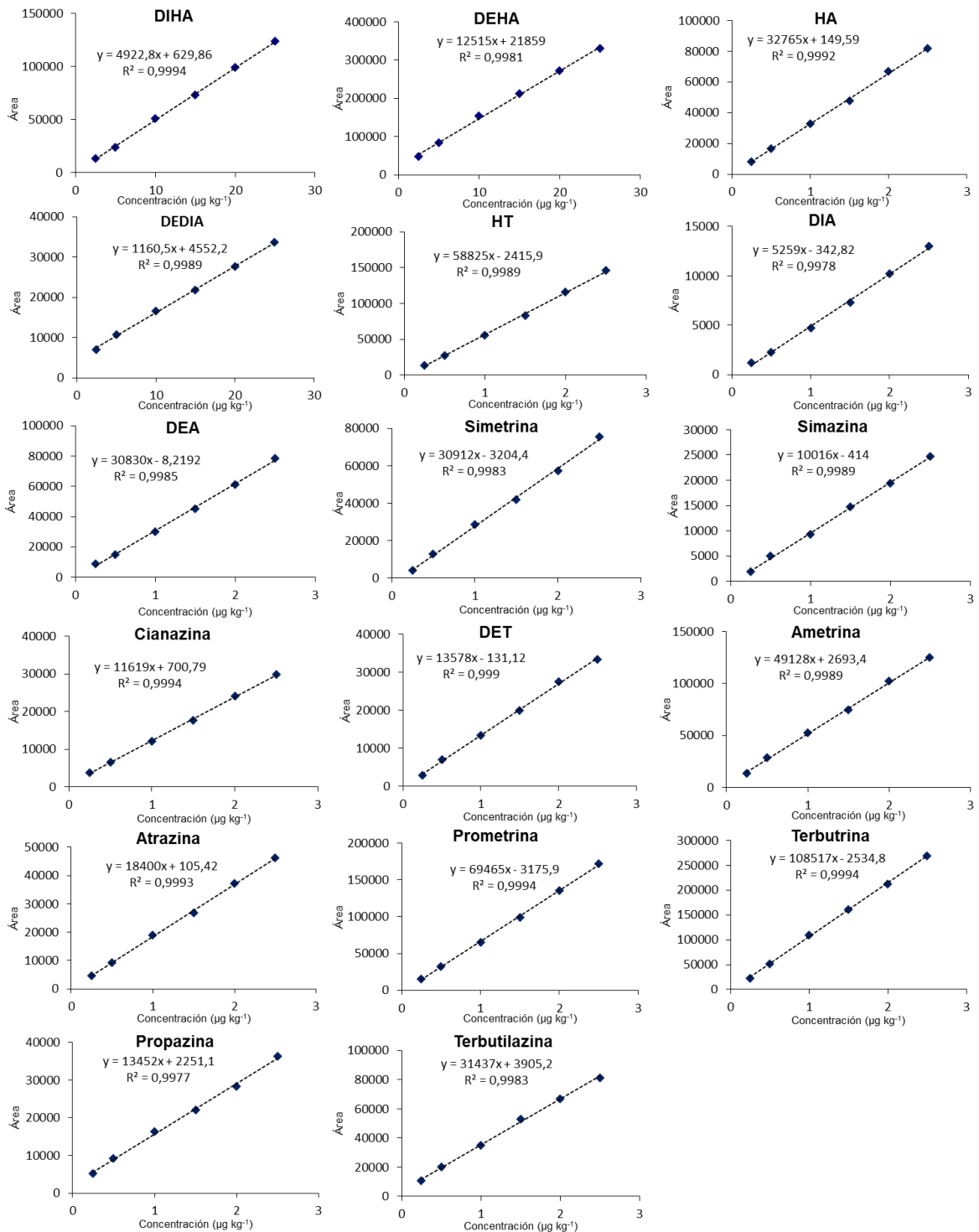


Figura 5.3. Rectas de calibrado del método MSPD

Tabla 5.6. Límites de detección y cuantificación del método MSPD

Compuesto	LOD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	LOQ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
DIHA	0.78	2.35
DEHA	1.40	4.26
HA	0.09	0.28
DEDIA	1.04	3.16
HT	0.11	0.33
DIA	0.15	0.45
DEA	0.13	0.38
Simetrina	0.13	0.40
Simazina	0.11	0.32
Cianazina	0.08	0.24
DET	0.10	0.31
Ametrina	0.10	0.32
Atrazina	0.08	0.26
Prometrina	0.08	0.23
Terbutrina	0.08	0.24
Propazina	0.15	0.46
Terbutilazina	0.13	0.40

5.3.2.3 Precisión

El estudio de precisión del método de dispersión de la matriz en fase sólida se evalúa mediante la repetibilidad y la reproducibilidad. La repetibilidad se estudió a dos niveles de concentración, uno de los niveles próximo a los LOQs de los compuestos y el otro nivel de concentración cinco veces mayor que el anterior. Para ello, cinco réplicas de 1g de sedimento se sobrecarga a dos niveles de concentración (0.5 y 2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para Ametrina, Atrazina, Cianazina, DEA, DET, DIA, HA, HT, Prometrina, Propazina, Simetrina, Simazina, Terbutrina y Terbutilazina y 5.0 y 25.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para DEDIA, DEHA y DIHA). Las réplicas de cada nivel de concentración se inyectan por duplicado. Como puede verse en la **tabla 5.7** los valores de repetibilidad obtenidos para todos los compuestos estudiados son satisfactorios, con desviaciones relativas estándar comprendidas entre 0.09 y 0.71 % para el nivel más bajo de fortificación y entre el 0.01 y 0.66 % para el nivel más alto.

La reproducibilidad se estudió a un nivel de concentración intermedio de 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para Ametrina, Atrazina, Cianazina, DEA, DET, DIA, HA, HT, Prometrina, Propazina,

Simetrina, Simazina, Terbutrina y Terbutilazina y 10 µg/kg para DEDIA, DEHA y DIHA). Cada día del estudio se sobrecargan cinco réplicas de 1 g de sedimento y el ensayo se realiza en tres días consecutivos. Como puede verse en la **tabla 5.7**, los valores obtenidos indican que el método es reproducible, ya que son inferiores a 0.75%.

5.3.2.4 Exactitud

La exactitud se evaluó mediante la sobrecarga de 1 g de sedimento a dos niveles de concentración (0.5 y 2.5 µg/kg para Ametrina, Atrazina, Cianazina, DEA, DET, DIA, HA, HT, Prometrina, Propazina, Simetrina, Simazina, Terbutrina y Terbutilazina, y 5.0 y 25.0 µg/kg para DEDIA, DEHA y DIHA). La exactitud se evalúa en términos de recuperación, analizando cinco réplicas a cada nivel. Los resultados se muestran en la **tabla 5.7**.

Tabla 5.7. Estudio de exactitud y precisión del método MSPD

Compuesto	Recuperación		Repetibilidad RSD (%)		Reproducibilidad RSD (%)
	Nivel bajo	Nivel alto	Nivel bajo	Nivel alto	
DIHA	97.2	96.9	0.26	0.61	0.34
DEHA	61.2	61.5	0.10	0.23	0.10
HA	60.9	61.0	0.48	0.09	0.49
DEDIA	76.6	77.1	0.71	0.22	0.73
HT	89.2	90.1	0.30	0.52	0.30
DIA	92.4	93.6	0.33	0.62	0.36
DEA	96.2	98.2	0.56	0.10	0.50
Simetrina	89.0	90.8	0.63	0.01	0.65
Simazina	97.7	94.4	0.16	0.42	0.17
Cianazina	96.9	98.4	0.13	0.27	0.14
DET	95.1	97.7	0.15	0.29	0.17
Ametrina	99.6	98.4	0.28	0.66	0.29
Atrazina	95.7	98.3	0.09	0.16	0.11
Prometrina	96.1	97.7	0.66	0.44	0.63
Terbutrina	97.7	99.3	0.16	0.19	0.17
Propazina	97.3	99.7	0.15	0.23	0.09
Terbutilazina	97.1	94.6	0.53	0.11	0.60

Para una adecuada cuantificación de los analitos, previamente se evaluó el efecto matriz comparando las pendientes de las curvas de calibrado obtenidas para cada compuesto preparadas en disolvente y en extractos de sedimento. Debido a que se observó ausencia de efecto matriz para todos los compuestos excepto para cianazina y DEHA, la cuantificación se realizó empleando el calibrado preparado en extractos de sedimento.

Como se puede observar en la **tabla 5.7**, los valores obtenidos para la recuperación de las triazinas y sus productos de degradación son superiores al 89% para ambos niveles de concentración para la mayoría de los compuestos estudiados, a excepción de DEDIA (77%) y DEHA y HA (ambos 61%). Estos resultados son muy satisfactorios ya que se encuentran en el rango 60-120%, mostrando en todos los casos una buena RSD.

Finalmente, en la **figura 5.4** se muestran los cromatogramas de las triazinas correspondientes al segundo segmento, por orden de elución, para una muestra de sedimento marino al nivel más bajo de sobrecarga.

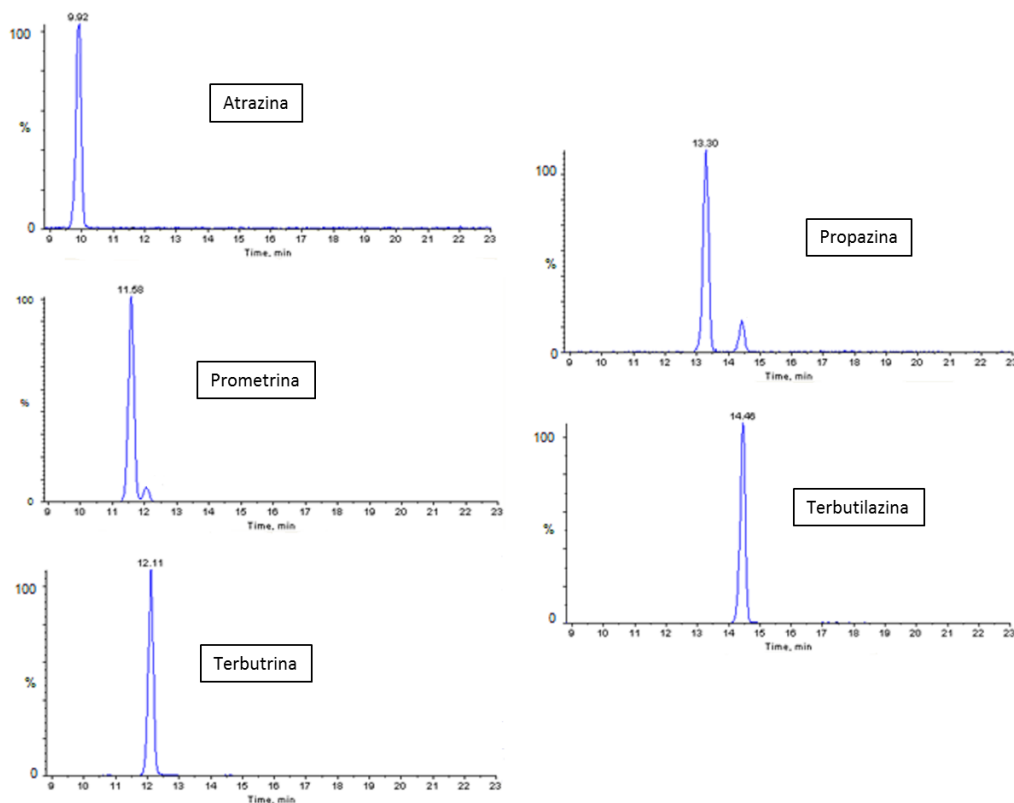


Figura 5.4. Cromatogramas LC-MS/MS de las triazinas del segundo segmento para una muestra de sedimento fortificada

6.

Conclusiones

Conclusiones

Se han validado dos métodos para la determinación simultánea de nueve herbicidas triazínicos (ametrina, atrazina, cianazina, prometrina, propazina, simazina, simetrina, terbutilazina y terbutrina) y ocho de sus principales productos de degradación (desetilatrazina, desetildesisopropilatrazina, desetilterbutilazina desisopropilatrazina, desetil-2-hidroxiatrazina, desisopropil-2-hidroxiatrazina, 2-hidroxiatrazina y 2-hidroxitertbutilazina) en agua de mar y sedimento. En agua de mar se emplea la extracción en fase sólida (SPE) como método de extracción mientras que en sedimento se emplea la dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD). Finalmente, la determinación analítica se lleva a cabo mediante LC-MS/MS.

Ambos métodos de extracción se basan en procedimientos desarrollados previamente para la extracción de las nueve triazinas empleando DAD como sistema de detección. Por ello, fue necesario realizar modificaciones de ambos métodos ya que en este trabajo se incluyó el análisis de sus principales productos de degradación y además se empleó el detector MS/MS. En el caso de SPE el volumen de muestra se redujo dada la alta sensibilidad que presenta el detector de masas y se modificó el volumen de agua milli-Q utilizada en la etapa de lavado para evitar pérdidas de los metabolitos más polares. Además se modificó el tipo y volumen de disolvente de elución, al no ser necesaria una etapa de concentración. En el caso de MSPD, debido a la mayor polaridad de los productos de degradación, se modificó el eluyente empleado.

Los métodos fueron validados en términos de linealidad, límites de detección y cuantificación, precisión y exactitud. La linealidad de las curvas de calibrado fue excelente ($R^2 > 0.99$) para todos los compuestos en ambas matrices. Además, la repetibilidad (0.12-1.41 % para agua de mar y 0.09-0.71 % para sedimentos) y reproducibilidad (0.02-1.06 % para agua de mar y 0.09-0.73 % para sedimentos) fueron satisfactorias. En el caso de la exactitud las recuperaciones son adecuadas (en el rango de 87.5-99.4 % y de 60.9-99.7 % para agua de mar y sedimento respectivamente), y Los límites de cuantificación obtenidos para agua de mar (0.05-0.45 $\mu\text{g/L}$) son mucho más bajos que los niveles establecidos por la Directiva Europea 2013/39/UE.

A la vista de los resultados obtenidos, es posible concluir que ambos métodos de extracción son adecuados para la determinación de las nueve triazinas y sus productos de degradación tanto en agua de mar como en sedimentos marinos. Cabe destacar que ambos métodos son simples, rápidos, de bajo coste, con bajo consumo de disolventes y de requerimientos energéticos de acuerdo a los principios de la Química Verde.

Conclusiones

Validáronse dous métodos para a determinación simultánea de nove herbicidas triazínicos (ametrina, atrazina, cianazina, prometrina, propazina, simazina, simetrina, terbutilazina e terbutrina) e oito dos seus principais produtos de degradación (desetilatraxina, desetil-desisopropilatraxina, desetil-terbutilazina, desisopropilatraxina, desetil-2-hidroxiatraxina, desisopropil-2-hidroxiatraxina, 2-hidroxiatraxina e 2-hidroxi-terbutilazina) en auga de mar e sedimento. En auga de mar emprégase a extracción en fase sólida (SPE) como método de extracción mentres que en sedimento emprégase a dispersión da matriz en fase sólida (MSPD). Finalmente, a determinación analítica lévase a cabo mediante LC-MS/MS.

Ámbolos dous métodos de extracción baséanse en procedementos desenvolvidos previamente para a extracción das nove triazinas empregando DAD como sistema de detección. Por iso, foi necesario realizar modificacións en ambos métodos debido a que neste traballo incluíuse a análise dos seus principais produtos de degradación e ademais empregouse o detector MS/MS. No caso de SPE o volume de mostra reduciuse dada a alta sensibilidade que presenta o detector de masas e modificouse volume de auga milli-Q utilizada na etapa de lavado para evitar perdas dos metabolitos máis polares. Ademais modificouse o tipo e volume de disolvente de elución, ao non ser necesaria unha etapa de concentración. No caso de MSPD, dada a maior polaridade dos produtos de degradación, modificouse o eluínte empregado.

Os métodos foron validados en termos de linearidade, límites de detección e cuantificación, precisión e exactitude. A linearidade das curvas de calibrado foi excelente ($R^2 > 0.99$) para todos os compostos en ambas matrices. Ademais, a repetibilidade (0.12-1.41 % para auga de mar e 0.09-0.71 % para sedimentos) e a reproducibilidade (0.02-1.06 % para auga de mar e 0.09-0.73 % para sedimentos) foron satisfactorias. No caso da exactitude, as recuperacións foron adecuadas (no rango de 87.5-99.4 % e de 60.9-99.7 % para auga de mar e sedimento respectivamente) e os límites de cuantificación obtidos para auga de mar (0.05-0.45 $\mu\text{g/L}$) foron moito máis baixos cós niveis establecidos pola Directiva Europea 2013/39/UE.

Á vista dos resultados obtidos, é posible concluir que ámbolos dous métodos de extracción son adecuados para a determinación das nove triazinas e os seus produtos de degradación tanto en auga de mar coma en sedimentos mariños. Cabe destacar que ambos métodos son sinxelos, rápidos, de baixo custe, con baixo consumo de disolventes e de requirimentos enerxéticos de acordo aos principios da Química Verde.

Conclusiones

Selective and sensitive methods have been validated for the determination of nine triazines herbicides (ametryn, atrazine, cyanazine, prometryn, propazine, simazine, simetryn, terbuthylazine and terbutryn) and eight degradation products (desethylatrazine, desethyl-desisopropylatrazine, desethyl-terbuthylazine, desisopropylatrazine, desethyl-2-hydroxyatrazine, desisopropyl-2-hydroxyatrazine, 2-hydroxyatrazine and 2-hydroxyterbuthylazine) in seawater samples and marine sediments. Solid-phase extraction (seawater samples) and matrix solid phase dispersion (marine sediments) coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry were employed for simultaneous analysis of all compounds (LC-MS/MS).

Both extraction methods are based on procedures previously developed for extracting the nine triazines using DAD as detection system. For this reason, it was necessary to modify both methods since in this work, the analysis of their main degradation products was included and, in addition, the detector MS/MS was employed. Regarding SPE, sample volume was reduced due to the high sensitivity of mass detector and milli-Q volume used for the washing step was modified to avoid losses of the more polar metabolites. Furthermore, the type and volume of elution solvent was modified due to a concentration step was not necessary. In the case of MSPD, due to the higher polarity of the degradation products, the eluent was modified.

Both methods were validated in terms of linearity, detection and quantification limits, precision and accuracy. The linearity of the calibration curves was excellent yielded the coefficients of determination higher than 0.99 for all the target analytes. Furthermore, intra-day precision (0.12-1.41 % for seawater samples and 0.09-0.71 % for sediments) and inter-day precision (0.02-1.06 % for seawater samples and 0.09-0.73 % for sediments) were shown to be satisfactory. Regarding accuracy, recoveries were acceptable (87.5-99.4 % and 60.9 and 99.7 % for seawater and marine sediments respectively) and limits of quantification (LOQ) obtained for seawater (0.05 to 0.45 µg/L) were much lower than the levels established by the Directive 2013/39/UE.

Therefore, it can be concluded that both extraction methods are suitable for the simultaneous determination of nine triazines and their degradation products in seawater and in marine sediments. It is worthy to note that both methods are simple, fast, low cost, with a lower consumption of solvents and energy requirements according to the principles of Green Chemistry.

7.

Bibliografía

Bibliografía

Abbas H.H., Elbashir A.A., Aboul-Enein H.Y. (2015). Chromatographic methods for analysis of triazine herbicides. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 45:3, 226-240.

Ahmed F.E. (2001). Analyses of pesticides and their metabolites in foods and drinks. *Trac-Trend Anal. Chem.* 20, 649-661.

Akdogan A., Divrikli U., Elci L. (2013). Determination of triazine herbicides and metabolites by solid phase extraction with HPLC analysis. *Anal. Lett.* 46(15), 2464-2477.

Barker S.A. (2000). Matrix solid-phase dispersion. *J. Chromatogr. A* 885, 115-127.

Beceiro-González E., González-Castro M.J., Pouso-Blanco R., Muniategui-Lorenzo S., López Mahía P., Prado-Rodríguez D. (2014). A simple method for simultaneous determination of nine triazines in drinking water. *Green Chem. Lett. Rev.* 7, 271-277.

Benvenuto F., Marín J.M., Sancho J.V., Canobbio S., Mezzanotte V., Hernández F. (2010). Simultaneous determination of triazines and their main transformation products in surface and urban wastewater by ultra-high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 397, 2791-2805.

Brondi S.H.G., de Macedo A.N., Vicente G.H.L., Nogueira A.R.A. (2011). Evaluation of the QuEChERS method and gas chromatography-mass spectrometry for the analysis of pesticide residues in water and sediment. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 86, 18-22.

Calvet, E. Barriusco, C. Bedos, P. Benoit, M.P. Charnay, Coquet, Y. Les pesticides dans le sol. Conséquences agronomiques et environnementales. Éditions France Agricole, 2005. ISBN: 2-85557-119-7.

Camino-Sánchez F.J., Zafra-Gómez A., Pérez-Trujillo J.P., Conde-González J.E., Marques J.C., Vilchez J.L. (2011). Validation of a GC-MS/MS method for simultaneous determination of 86 persistent organic pollutants in marine sediments by pressurized liquid extraction followed by stir bar sorptive extraction. *Chemosphere* 84, 869-881.

Capriotti A.L., Cavaliere Ch., Lagana A., Piovesana S., Samperi R. (2013). Recent trends in matrix solid-phase dispersion. *Trends Anal. Chem.* 43, 53-66.

Carabias-Martínez R., Rodríguez-Gonzalo E., Herrero Hernández E., Sánchez-San Román F.J., Prado Flores M.G. (2002). Determination of herbicides and metabolites by solid-phase extraction and liquid chromatography Evaluation of pollution due to herbicides in surface and groundwaters. *J. Chromatogr. A* 950, 157-166.

Bibliografía

Carpinteiro I., Abuin B., Ramil M., Rodríguez I., Cela R. (2012). Matrix solid-phase dispersion followed by gas chromatography tandem mass spectrometry for the determination of benzotriazole UV absorbers in sediments. *Anal. Bioanal. Chem.* 402, 519-527.

Commision Directive 2000/60/EC, Establishment and Framework for Community Action in the Field of Water Policy. *Off. J. Eur. Commun L 327*, 1-73 (2000).

Commission Directive 2008/105/EC, Environmental Quality Standards in the Field of Water Policy. *Off. J. Eur. Commun. L 348*, 84-97 (2008).

Commission Directive 2013/39/EU, amending the Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy. *L 226*, 1-17 (2013).

Council of European Commission. (1998) Directive on the quality of water intended for human consumption (98/83/EC). *Off. J. Eur. Commun. L330*.

Council of European Commission. (2001) Decision implementing Council Directive 2000/60/EC establishing the list of priority substances in the field of water (2455/2001/EC). *Off. J. Eur. Commun. L331*.

Devault D.A., Ith C., Merlina G., Lim P., Pinelli E. (2010). Study of a vertical profile of pre-emergence herbicide contamination in Middle Garonne sediments. *Intern. J. ENVIron. Anal. Chem.* 90, 311-320.

Directive 80/778/EEC of 15 July 1980 on the Quality of Water Intended for Human Consumption Twelve 229 / L 30-08-80.

Fernández N., Fernández- Boán M., Verísimo P., Freire J. (2013). Assessing the spatial variability, level and source of organic chemical contaminants in bivalve fishing grounds on the Galician coast (NW Spain). *Mar. Pollut. Bull.* 74, 291-301.

Galanopoulou S., Vgenopoulos A., Conispoliatis N. (2005). DDTs and other chlorinated organic pesticides and polychlorinated biphenyls pollution in the surface sediments of Keratsini harbour, Saronikos gulf, Greece. *Mar. Pollut. Bull.* 50, 520–525.

García-López M., Canosa P., Rodríguez I. (2008). Trends and recent applications of matrix solid phase dispersion. *Anal. Bioanal. Chem.* 391, 963-974.

Gervais G., Brosillon S., Laplanche A., Helen C. (2008) Ultra-pressure liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry for multiresidue determination of pesticides in water. *J. Chromatogr. A* 1202, 163-172.

Gikas E., Papadopoulos N.G., Bazoti F.N., Zalidis G., Tsaibopoulos A. (2012). Use of Liquid Chromatography/Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry to Study the Degradation Pathways of Terbutylazine (TER) by *Typha latifolia* in Constructed Wetlands: Identification of a New TER metabolite. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 26(2), 181-188.

Gilart N., Borrul F., Fontanals N., Marcé R.M. (2014). Selective materials for solid-phase extraction in environmental analysis. *Trends Environ. Anal. Chem.* 1, 8-18.

González-Mariño I., Rodríguez I., Quintana J., Cela R. (2010). Matrix solid-phase dispersion followed by gas chromatography-mass spectrometry for the determination of triclosan and methyl triclosan in sludge and sediments. *Anal. Bioanal. Chem.* 398, 2289-2297.

Hela D.G., Lambropoulou D.A., Konstantinou I.K., Albanis T.A. (2005). Environmental monitoring and ecological risk assessment for pesticide contamination and effects in lake Pamvotis, northwestern Greece. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 1548-1556.

Hu Y., Wang Y., Hu Y., Li G. (2009). Liquid-liquid-solid microextraction based on membrane-protected molecularly imprinted polymer fiber for trace analysis of triazines in complex aqueous samples. *J. Chromatogr. A* 1216, 8304-8311.

Huff T.B., Foster G.D. (2011). Parts-per-trillion LC-MS (Q) analysis of herbicides and transformation products in surface water. *J. Environ. Sci. Health Part B* 46, 723-734.

Hurtado-Sánchez M.C., Romero-González R., Rodríguez-Cáceres M.I., Durán-Merás I., Garrido-Frenich A. (2013). Rapid and sensitive on-line solid phase extraction-ultra high performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry analysis of pesticides in surface waters. *J. Chromatogr. A* 1305, 193-202.

Kalogridi E.C., Christophoridis C., Bizani E., Drimaropoulou G., Fytianos K. (2014). Part II: temporal and spatial distribution of multiclass pesticide residues in lake sediments of northern Greece: application of an optimized MAE-LC-MS/MS pretreatment and analytical method. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21, 7252-7262.

Kristenson E.M, Ramos L., Brinkman U.A.T. (2006). Recent advances in matrix solid-phase dispersion. *Trends Anal. Chem.* 25, 96-111.

Krutz L.J., Shaner D.L., Weaver M.A., Webb R.M.T., Zablotowicz R.M., Reddy K.N., Huang Y., Thomson S.J. (2009). Agronomic and environmental implications of enhanced s-triazine degradation. *Pest. Manag. Sci.*, 66, 461-481.

LeBaron H.M, McFarland, J.E., Burnside, O.C. The triazine Herbicides. 50 Years Revolutionizing Agriculture. Elsevier, 2008. ISBN: 978-0-444-51167-6.

Li Y. N., Wu H. L., Qing X.D., Li Q., Li S.F., Fu H.Y., Yu Y.J., Yu R.Q. (2010). Quantitative analysis of triazine herbicides in environmental samples by using high performance liquid chromatography and diode array detection combined with second-order calibration based on an alternating penalty trilinear decomposition algorithm. *Anal. Chim. Acta* 678, 26-33.

Li P., Yang X., Miao H., Zhao Y., Liu W., Wu Y. (2013). Simultaneous Determination of 19 Triazines Pesticides and Degradation Products in Processed Cereal Samples from Chinese Total Diet Study by Isotope Dilution-High Performance Liquid Chromatography-Linear Ion Trap Mass Spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 781, 63-71.

Masiá A., Campo J., Vázquez-Roig P., Blasco C., Picó Y. (2013) Screening of currently used pesticides in water, sediments and biota of the Guadalquivir River Basin (Spain). *J. Hazard. Mater.* 263, 95-104.

Mohammadi A., Ameli A., Alizadeh N. (2009). Headspace solid phase microextraction using a dodecylsulfate-doped polypyrrole film coupled to ion mobility spectrometry for the simultaneous determination of atrazine and ametryn in soil and water samples. *Talanta* 78, 1107-1114.

Nödler K., Licha T., Voutsas D. (2013). Twenty years later – Atrazine concentrations in selected coastal waters of the Mediterranean and the Baltic Sea. *Mar. Pollut. Bull.* 70, 112-118.

Pacáková V., Štulík K. & Jiskra J. (1996). High-performance separations in the determination of triazine herbicides and their residues. *J. Chromatogr. A* 754, 17-31.

Papadopoulos N.G., Gikas E., Zalidis G., Tsaibopoulos A. (2007). Simultaneous determination of terbuthylazine and its major hydroxy and dealkylated metabolites in wetland water samples using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode-array detection. *J. Agric. Food Chem.* 55, 7270-7277.

Papadopoulos N.G., Gikas E., Zalidis G., Tsarbopoulos A. (2012). Determination of herbicide terbuthylazine and its major hydroxyl and dealkylated metabolites in constructed wetland sediments using solid phase extraction and high performance liquid chromatography-diode array detection. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* 92, 1429-1442.

Pérez R., Albero B., Miguel E., Sánchez-Brunete C. (2012). Determination of parabens and endocrine-disrupting alkylphenols in soil by gas chromatography–mass spectrometry following matrix solid-phase dispersion or in-column microwave-assisted extraction: a comparative study. *Anal. Bioanal. Chem.* 402, 2347-2357.

Peterson D.E., Thompson C.R., Shoup D.E., Olson B.L. (2001). Herbicide mode of action. Kansas State University Research and Extension: Manhattan, KS.

Postigo C., López de Alda M.J., Barceló D., Ginebreda A., Garrido T., Fraile J. (2010) Analysis and occurrence of selected medium to highly polar pesticides in groundwater of Catalonia (NE Spain): An approach based on on-line solid phase extraction-liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry detection. *J. Hydrol.* 383, 83-92.

Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and 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. *Off. J. Eur. Commun* L70, 1-16 (2005).

Retamal M., Costa C., Suárez J.M., Richter P. (2013). Multi-determination of organic pollutants in water by gas chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. *Int. Environ. Anal. Chem.* 93(1), 93-107.

Rodríguez-González N., Beceiro-Gonzalez E., González-Castro M.J., Muniategui-Lorenzo S. (2013). Application of a Developed Method for the Extraction of Triazines in Surface Waters and Storage Prior to Analysis Seawaters of Galicia (Northwest Spain). *Sci. World J.* doi:10.1155/2013/536369.

Rodríguez-González N., González-Castro M.J., Beceiro-González E., Muniategui-Lorenzo S., Prada-Rodríguez D. (2014). Determination of Triazine Herbicides in Seaweeds: Development of a simple preparation method base on Matrix Solid Phase Dispersion and Solid Phase Extraction Clean-up. *Talanta* 121, 194-198.

Rodríguez-González N., Beceiro-González E., González-Castro, M.J., Muniategui-Lorenzo, S. (2015). An environmentally friendly method for the determination of triazine

herbicides in estuarine seawater samples by dispersive liquid-liquid microextraction. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 618-626.

Rodríguez-González N., Beceiro-González E., González-Castro M.J., Muniategui-Lorenzo S. (2016). Development of a Matrix Solid Phase Dispersion Methodology for the Determination of Triazine Herbicides in Marine Sediments. *Anal. Bioanal. Chem.* In press.

Sanagi M.M., Abbas H.H., Ibrahim W.A.W., Aboul-Enien H.Y. (2012). Dispersive liquid-liquid microextraction method based on solidification of floating organic droplet for the determination of triazine herbicides in water and sugarcane samples. *Food Chem.* 133, 557-562.

Sánchez-Brunete C., Miguel E., Albero B., Tadeo J. (2010). Determination of triclosan and methyl triclosan in environmental solid samples by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Sep. Sci.* 33, 2768-2775.

Sánchez-Ortega A., Unceta N., Gómez-Caballero A. (2009). Sensitive determination of triazines in underground waters using stir bar sorptive extraction directly coupled to automated thermal desorption and gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta.* 641, 110-116.

Schrack D., Coquil X., Ortar A., Benoît M. (2009). Rémanence des pesticides dans les eaux issues de parcelles agricoles récemment converties à l'Agriculture Biologique. *Innovations Agronomiques*, 4, 259-268.

Souza-Caldas, S., Bolzan, C.M., Jaime de Menezes, E., Venquiaruti-Escarrone, A.L., Gaspar-Martins, C. de M., Bianchini, A. & Gilberto-Primel, E. (2013). A vortex-assisted MSPD method for the extraction of pesticide residues from fish liver and crab hepatopancreas with determination by GC-MS. *Talanta* 112, 63-68.

Trić-Petrović T., Dordević J., Dujaković N., Kumrić K., Vasiljević T., Laušević M. (2010). Determination of selected pesticides in environmental water by employing liquid-phase microextraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 397, 2233-2243.

Tseng, S.H., Lin, Y.J., Chang, P.C., Chou, S.S. & Chang H.M. (2004). Determination of simazine residue in sugarcane by application of matrix solid phase dispersion (MDPD) technique. *J. Food Drug. Anal.* 12, 74-78.

Bibliografía

Van Pinxteren M., Bauer C., Popp P. (2009). High performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of 10 pesticides in water: A comparison between membrane-assisted solvent extraction and solid phase extraction. *J. Chromatogr. A* 1216, 5800-5806.

Wang S.L., Ren L.P., Liu C.Y., Ge J., Liu F.M. (2010). Determination of five polar herbicides in water samples by ionic liquid dispersive liquid-phase microextraction. *Anal. Bioanal. Chem.* 397, 3089-3095.

Wang C., Ji S., Wu Q., Wu C., Wang Z. (2011). Determination of triazine herbicides in environmental samples by dispersive liquid-liquid microextraction coupled with high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. Sci.* 49(9), 689-694.

Wen Y.Y., Chen L.X., Li J.H., Ma Y.L., Xu S.F., Zhang Z., et al. (2012). Molecularly imprinted matrix solid-phase dispersion coupled to micellar electrokinetic chromatography for simultaneous determination of triazines in soil, fruit, and vegetable samples. *Electrophoresis* 33(15), 2453-2463.

Wu X.L, Meng L., Wu Y., Luk Y.Y, Ma Y., Du Y. (2015). Evaluation of Graphene for Dispersive Solid-Phase Extraction of Triazine and Neonicotine Pesticides from environmental Water. *J. Braz. Chem. Soc.* 26, 131-139.

Yang B.Y., Qi F.F, Li X.Q., Liu J.J, Rong F., Xu Q. (2015). Application of Nylon6/Polypyrrole core-shell nanofibres mat as solid-phase extraction adsorbent for the determination of atrazine in environmental water samples. *Int. J. Environ. An. Ch.* 95, 1112-1123.

Zhang P., Bui A., Rose G., Allinson G. (2014). Mixed-mode solid-phase extraction coupled with liquid chromatography tandem mass spectrometry to determine phenoxy acid, sulfonylurea, triazine and other selected herbicides at nanogram per litre levels in environmental waters. *J. Chromatogr. A* 1325, 56-64.

Zhou Q.X., Pang L., Xie G.H., Xiao J.P., Bai H.H. (2009). Determination of atrazine and simazine in environmental water samples by dispersive liquid-liquid microextraction with high performance liquid chromatography. *Anal. Sci.* 25, 73-76.