

Curso 2009/10
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS/33
I.S.B.N.: 978-84-7756-979-4

LIDIA MARÍA RAVELO PÉREZ

**Metodologías analíticas alternativas
para la determinación de plaguicidas
en aguas y productos agroalimentarios**

Directores

**MIGUEL ÁNGEL RODRÍGUEZ DELGADO
JAVIER HERNÁNDEZ BORGES**



SOPORTES AUDIOVISUALES E INFORMÁTICOS
Serie Tesis Doctorales

Agradecimientos

Quisiera sintetizar en unas breves líneas mi sentida y sincera gratitud hacia las personas que me han ayudado, de una forma u otra, en los cuatro años más importantes, intensos y fascinantes de mi trayectoria profesional. Sin ellas hubiese sido del todo imposible afrontar con éxito la elaboración de esta Tesis Doctoral, que representa la culminación de un gran esfuerzo y en la que tanta ilusión he puesto.

Mi más sincero agradecimiento a mis directores de Tesis, los Dres. Miguel Ángel Rodríguez y Javier Hernández. Quisiera que estas palabras no fueran consideradas como una simple formalidad para cubrir un requisito impuesto por la costumbre, sino un sentimiento de profundo reconocimiento hacia ellos. A ambos, por iniciarme y guiarme en el fascinante mundo de la investigación, permitiéndome llamarles cariñosamente “dire”. A Miguel Ángel, por haber confiado en mí desde el principio, por escuchar y respetar siempre mis sugerencias e ideas y por su imprescindible papel en el laboratorio. A Javi, por su continuo apoyo y estímulo, su constante interés y dedicación y por transmitirme siempre su optimismo en los momentos más difíciles, especialmente en la etapa final de esta Tesis.

A mi querido profesor García Montelongo, por darme la oportunidad de iniciarme en la investigación y seguir de cerca mi trayectoria en estos años, por sus buenos consejos y por transmitirme su pasión por la Química.

Gracias también a María y Antonio, por acompañarme en el día a día del laboratorio, regalándome tantos buenos momentos y, sobre todo, por hacer tuyas mis alegrías y mis dificultades.

A todos los miembros del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, especialmente a los profesores Tere Borges, M^a Jesús Sánchez y Luis Galindo, por sus enseñanzas tanto en la carrera como en el doctorado y por sus ánimos y apoyo en esta última etapa.

Agradezco también al Ministerio de Ciencia e Innovación la concesión de la ayuda económica del Programa de Formación del Profesorado Universitario, FPU.

A todos mis amigos, que siempre han estado presentes en mis logros y me han apoyado en mis peores momentos, por ayudarme a escapar de las preocupaciones de la Tesis y, en especial, por tantos ratos estupendos que he pasado y espero pasar en su compañía.

A Carmen y Luci, que han seguido mi trayectoria día tras día, apoyándome en todo momento, regalándome todo su cariño y los mejores consejos.

Un profundo agradecimiento a toda mi familia, especialmente a mis padres, Antonio y Onelia y a mi hermano Antonio, las personas más nobles que conozco, siempre preocupados por mi felicidad, alentadores y reconfortantes en los momentos bajos y quienes me han hecho crecer como persona. Gracias por confiar siempre en mí, por vuestro amor incondicional y por estar siempre a mi lado, a pesar de no haberles dedicado estos años el tiempo que se merecen.

Y de una manera muy especial a Jose, no sólo por su apoyo en aspectos informáticos y en el diseño de la Tesis, sino por todo lo que me aporta en el ámbito personal. Le agradezco profundamente su disponibilidad, su apoyo sin límites, sus buenos consejos, su comprensión y su paciencia mostrados durante todos estos años. Gracias Jose, por darme cada día lo mejor de mi vida...

*A todos y cada uno de ellos,
por todo esto y por mucho más,
MUCHAS GRACIAS*

Lidia María Ravelo Pérez, Mayo 2009

A mi hermano, Antonio
A mis padres, Antonio y Onelia
A Jose

ÍNDICE |

ACRÓNIMOS.....	vii
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	1
I.1 Plaguicidas	3
I.1.1 Importancia y evolución histórica	3
I.1.2 Denominación y clasificación	8
I.1.3 Efectos de los plaguicidas sobre el medio ambiente	9
I.1.4 Efectos de los plaguicidas sobre la salud humana	14
I.1.5 Legislación	16
I.1.5.1 Legislación en aguas en el marco de la Unión Europea.....	19
I.1.5.2 Legislación en alimentos en el marco de la Unión Europea.....	20
I.1.6 Consumo de plaguicidas en Europa y en España	23
I.1.6.1 Consumo de plaguicidas en las Islas Canarias	26
I.1.7 Estudios realizados en las Islas Canarias	31
I.2 Técnicas cromatográficas y electroforéticas para el análisis de plaguicidas.....	34
I.2.1 Cromatografía de gases.....	36
I.2.2 Cromatografía líquida de alta eficacia.....	42
I.2.3 Electroforesis capilar	49
I.3 Preparación de la muestra para el análisis de plaguicidas.....	57
I.3.1 Extracción líquido-líquido.....	61
I.3.1.1 Extracción en el punto de nube.....	63
I.3.1.2 Microextracción líquido-líquido	64
I.3.2 Extracción sólido-líquido	65
I.3.3 Extracción en fase sólida	69
I.3.3.1 Dispersión de la matriz en fase sólida	73

I.3.4 Microextracción en fase sólida.....	76
I.3.4.1 Extracción sobre barra magnética agitadora.....	81
CAPÍTULO II. OBJETIVOS	83
CAPÍTULO III. PARTE EXPERIMENTAL.....	87
III.1 Reactivos y disoluciones.....	89
III.2 Equipos e instrumentos.....	90
III.2.1 Equipo de GC	90
III.2.2 Equipo de HPLC.....	91
III.2.3 Equipo de CE.....	91
III.2.4 Otros equipos e instrumentos.....	92
III.3 Programas informáticos	93
III.4 Muestras.....	94
III.5 Procedimientos experimentales	94
III.5.1 Procedimientos experimentales utilizados en las determi- naciones por CE	94
III.5.2 Procedimientos experimentales utilizados en las determi- naciones por GC.....	97
III.5.3 Procedimientos experimentales utilizados en las determi- naciones por HPLC.....	98
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	101
IV.1 Aplicación de la cromatografía electrocinética micelar en combinación con la extracción en fase sólida y técnicas de <i>stacking</i> para la determinación de un grupo de doce plaguicidas en aguas	103
IV.1.1 Antecedentes	103
IV.1.2 Separación electroforética	106
IV.1.3 Validación del método	119

IV.1.4 Procedimiento de SPE de aguas	120
IV.1.5 Conclusiones.....	128
IV.2 Análisis de plaguicidas en vinos blancos, rosados y tintos mediante el uso combinado de la microextracción en fase sólida, <i>stacking</i> y cromatografía electrocinética micelar	130
IV.2.1 Antecedentes	130
IV.2.2 Optimización del procedimiento de SPME.....	132
IV.2.3 Validación del método	139
IV.2.4 Aplicación del procedimiento de SPME-REPSM-MEK-C-DAD a muestras de vino	148
IV.2.5 Conclusiones.....	152
IV.3 Determinación de plaguicidas en tomates por electroforesis capilar con detección DAD combinada con la microextracción en fase sólida y <i>stacking</i> ...	154
IV.3.1 Antecedentes	154
IV.3.2 Procedimiento de SPE de extractos de tomate.....	157
IV.3.3 Procedimiento de SPME de extractos de tomate	159
IV.3.4 Validación del método	163
IV.3.5 Aplicación del método de SPME-REPSM-MEK-C-DAD al análisis de tomates.....	165
IV.3.6 Conclusiones.....	166
IV.4 Uso de nanotubos de carbono de pared múltiple como fase estacionaria para la extracción de plaguicidas de aguas y zumos de frutas previamente a su determinación por cromatografía de gases	169
IV.4.1 Antecedentes	169
IV.4.2 Separación por GC-NPD.....	171
IV.4.3 Optimización del procedimiento de SPE	175
IV.4.3.1 Influencia del tipo y volumen de disolvente de elución...	176
IV.4.3.2 Influencia del pH de la muestra.....	177

IV.4.3.3 Influencia de la cantidad de MWCNTs y del volumen de muestra.....	178
IV.4.4 Aplicación del método de SPE-GC-NPD a muestras de agua	180
IV.4.4.1 Validación del método.....	180
IV.4.5 Aplicación del método de SPE-GC-NPD a zumos de frutas	183
IV.4.5.1 Validación del método.....	187
IV.4.6 Análisis de diferentes muestras de agua y zumos de frutas comerciales.....	192
IV.4.7 Conclusiones.....	196
 IV.5 Aplicación de la microextracción líquido-líquido dispersiva con líquidos iónicos como agentes de extracción para el análisis de plaguicidas en plátanos.....	 198
IV.5.1 Antecedentes	198
IV.5.2 Separación por HPLC-DAD.....	201
IV.5.3 Optimización del procedimiento de DLLME.....	205
IV.5.4 DLLME-HPLC-DAD de muestras de plátano.....	214
IV.5.4.1 Validación del método.....	217
IV.5.5 Análisis de diferentes muestras de plátano comerciales.....	222
IV.5.6 Conclusiones.....	226
 CAPÍTULO V. CONCLUSIONES	 229
 BIBLIOGRAFÍA	 233

ACRÓNIMOS



ACN	Acetonitrilo
AEPLA	Asociación empresarial para la protección de las plantas
AESA	Autoridad europea de seguridad alimentaria
ASE	Extracción acelerada con disolventes
BGE/BGEs	Electrolito(s) de separación
BPA	Buenas prácticas agrícolas
CAR	Carboxen
CE	Electroforesis capilar
CEC	Electrocromatografía capilar
CGE	Electroforesis capilar en gel
CIEF	Isoelectroenfoque capilar
CITP	Isotacoforesis capilar
CMC	Concentración micelar crítica
CNT	Nanotubo de carbono
CPE	Extracción en el punto de nube
CW	Carbowax
CZE	Electroforesis capilar en zona
DAD	Detección con diodos integrados
DDD	1,1-dicloro-2,2-bis(4-clorofenil)etano
DDE	1,1-dicloro-2,2-bis(4-clorofenil)etileno
DDT	1,1,1-tricloro-2,2-bis(4-clorofenil)etano
DI-SPME	Microextracción en fase sólida con inmersión directa
DL ₅₀	Dosis letal para matar al 50% de los organismos
DLLME	Microextracción líquido-líquido dispersiva
DMA	Directiva Marco de Aguas
DVB	Divinilbenceno
ECD	Detector de captura electrónica
EI	Ionización por impacto electrónico
EOF	Flujo electroosmótico
EPA	Agencia de Protección Medioambiental de los Estados Unidos
ESI	Interfase electrospray

FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
FD	Detector de fluorescencia
FID	Detector de ionización de llama
FPD	Detector de fotometría de llama
GC	Cromatografía de gases
GCxGC	Cromatografía de gases bidimensional
HCB	Hexaclorobenceno
HCH	Hexaclorociclohexano
HF-LPME	Microextracción líquido-líquido en membrana
HPGPC	Cromatografía de permeación en gel de alta presión
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
HSSE	Extracción sobre barra magnética agitadora en espacio en cabeza
HS-SPME	Microextracción en fase sólida en espacio en cabeza
ICP	Plasma acoplado por inducción
IT	Trampa de iones
LC	Cromatografía de líquidos
LCxLC	Cromatografía de líquidos bidimensional
LIF	Fluorescencia inducida por láser
LLE	Extracción líquido-líquido
LLME	Microextracción líquido-líquido
LMR/LMRs	Límite(s) máximo(s) de residuos
LOD/LODs	Límite(s) de detección
LOQ/LOQs	Límite(s) de cuantificación
LPME	Microextracción en fase líquida
MAE	Extracción asistida por microondas
MAME	Extracción micelar asistida por microondas
MAPA	Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación de España
MARM	Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino de España
MASE	Extracción con disolventes asistida por membranas
MEKC	Cromatografía electrocinética micelar

MIm	Metilimidazolio
MIP	Polímeros de impronta molecular
MS	Espectrometría de masas
MS ⁿ	Espectrometría de masas en tándem
MSPD	Dispersión de la matriz en fase sólida
Mw	Peso molecular
MWCNTs	Nanotubos de carbono de pared múltiple
NACE	Electroforesis capilar en medios no acuosos
NPD	Detector de nitrógeno-fósforo
NSM	<i>Stacking</i> en modo normal
OMS	Organización Mundial de la Salud
PA	Poliacrilato
PAHs	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
PCBs	Bifenilos policlorados
PDMS	Polidimetilsiloxano
PEG	Polietilenglicol
PLE	Extracción con fluidos presurizados
PMS	Polimetilsiloxano
PPMS	Polifenilmetilsiloxano
PS	Poliestireno
PSA	Amina primaria/secundaria
Q	Cuadrupolo
QqQ	Triple cuadrupolo
QuEChERS	Método de preparación de muestras " <i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe</i> "
RASFF	Sistema de alerta rápida para alimentos y piensos
REPSM	<i>Stacking</i> en modo de polaridad invertida
RSD	Desviación estándar relativa
SBSE	Extracción sobre barra magnética agitadora
SDME	Microextracción en gota
SDS	Dodecil sulfato sódico
SMB	Haz molecular supersónico
SPE	Extracción en fase sólida

Acrónimos

SPME	Microextracción en fase sólida
SWCNTs	Nanotubos de carbono de pared simple
SWMR	<i>Stacking</i> con eliminación de matriz
TEOS	Tetraetoxisilano
TOF	Tiempo de vuelo
TMOS	Tetrametoxisilano
TPP	Trifenil fosfato
TPR	Resina templada
UE	Unión Europea
UPLC	Cromatografía líquida de ultra-alta presión
UV	Ultravioleta
VIS	Visible

1. INTRODUCCIÓN



I. INTRODUCCIÓN

I.1 Plaguicidas

I.1.1 Importancia y evolución histórica

La agricultura actual exige un esfuerzo dirigido a estudiar, desarrollar y valorar estrategias que aseguren e incrementen la producción agrícola con objeto de garantizar el suministro de alimentos de calidad a la creciente población mundial. En este sentido, la introducción de productos químicos de uso agrícola como los plaguicidas, ha revolucionado la agricultura hasta tal punto que este tipo de compuestos ha llegado a ser indispensable para producir cultivos en áreas en las que sin el uso de los mismos no sería posible, extender el período de desarrollo de las plantas, incrementar su rendimiento y producción así como mantener su calidad y aumentar su período de almacenamiento.

Si bien el concepto de plaguicida es relativamente moderno (siglo XIX), el empleo de diferentes sustancias para combatir las plagas se remonta a más de cuatro mil años atrás (Costa y col., 1987). De hecho, la problemática de las plagas que asolan a las cosechas ha preocupado al hombre desde el Neolítico, cuando comenzaron las prácticas agrícolas (parte de lo que se conoce como sedentarismo). Los propios egipcios utilizaban ciertos preparados médico/farmacéuticos para repeler insectos de las casas. La quema de azufre, todavía practicada por nuestros contemporáneos, se menciona en La Odisea de Homero (1000 a. de C.). Incluso los romanos utilizaban ciertas especies de plantas como raticidas. En general, los pueblos que tenían a la agricultura como ocupación básica y de gran importancia utilizaban, sobre todo, productos vegetales y minerales como plaguicidas. Muchos de estos métodos guardan cierto parecido con algunos de los utilizados actualmente.

Prescindiendo del hecho de que algunas prácticas agrícolas de este tipo fueron desarrolladas en la Antigüedad, es comúnmente admitido que el uso de este tipo de compuestos es relativamente reciente. En este sentido, es posible dividir la

historia de los plaguicidas en tres etapas claramente diferenciadas. En una primera etapa, a inicios del siglo XIX, se descubrió accidentalmente la acción plaguicida de elementos naturales como el azufre, el cobre, el arsénico, el fósforo, etc. Todas estas sustancias forman el grupo de los llamados insecticidas de primera generación. Son productos en general muy tóxicos, poco efectivos en la lucha contra la plaga y muy persistentes en el medio ambiente (hasta 50 años). Hoy día se utilizan muy poco y bastantes de ellos están incluso prohibidos por su excesiva toxicidad. Caso aparte lo constituyen las flores de pelitre, utilizadas secas y pulverizadas como insecticidas para matar garrapatas y otros insectos como pulgas y mosquitos. El uso de estas flores comenzó en Persia, de donde pasó al Cáucaso, introduciéndose en Europa a principios del siglo XIX. Actualmente, a partir de ellas se obtiene un insecticida conocido como piretrina, que se degrada rápidamente en el ambiente, especialmente al exponerse a la luz solar. También en esta época se utilizó por primera vez el caldo bordelés (sulfato cúprico, cal y agua) como fungicida, con objeto de eliminar el moho de la vid.

La segunda etapa comienza a partir de la Primera Guerra Mundial, en la que se prohibió la importación a Alemania de nitrato amónico y otros abonos nitrogenados procedentes de Chile (principal productor mundial) que podían utilizarse en la fabricación de explosivos. Como consecuencia, Alemania construyó importantes plantas industriales y amplió la capacidad de producción de amoníaco, mediante el proceso Haber-Bosch, a unas 120.000 toneladas de amoníaco sintético anuales. Una vez finalizada la guerra, la agricultura fue el mejor mercado para la industria química, que introdujo los denominados plaguicidas de síntesis. Estos avances de la ciencia y de la industria química hicieron posible la aparición de plaguicidas mejores que los naturales, concretamente los insecticidas denominados de segunda generación. La familia de plaguicidas más importante de esta época fue la de los organoclorados.

La tercera etapa de la historia de los plaguicidas abarca el período comprendido entre la Segunda Guerra Mundial y la actualidad. Muchos de los utilizados habían sido sintetizados durante la guerra como armas químicas. A modo de ejemplo, durante esta época se crearon los denominados gases de guerra, a

menudo conocidos bajo el apelativo de “gases nerviosos”, derivados del ácido fosfórico y concebidos para matar masivamente. Estos compuestos se conocen hoy en día como insecticidas organofosforados y fueron el motivo de que ya en 1959 se hubieran sintetizado alrededor de 50.000, al revelarse como útiles elementos de lucha contra las plagas de insectos. También el 1,1,1-tricloro-2,2-bis(4-clorofenil)etano (DDT), utilizado para matar insectos, surgió durante la guerra. Fue Müller en 1940 quien descubrió las propiedades insecticidas de este compuesto organoclorado, el cual fue utilizado para la eliminación del piojo humano que transmitía enfermedades como el tifus. A partir de 1977 fue prohibido su uso por su alta persistencia, su capacidad de acumulación en tejidos grasos y su alta toxicidad, aunque todavía hoy se encuentran restos de DDT en muestras de diversa índole. Después del descubrimiento de la acción insecticida del DDT en Suiza, se descubría simultáneamente en Francia y en el Reino Unido la del HCH (hexaclorociclohexano). Posteriormente, con la ayuda de los estudios científicos sobre plantas e insectos, se marca una nueva etapa en el desarrollo de nuevos fungicidas, herbicidas e insecticidas. Uno de los grupos más importantes es, probablemente, el de los piretroides o piretrinas sintéticos.

Actualmente, se utilizan centenares de plaguicidas de diferente naturaleza química mayoritariamente en agricultura, para eliminar malas hierbas, plagas y hongos de los cultivos, aunque también presentan aplicaciones no agrícolas, como el control de malas hierbas en vías de ferrocarril, carreteras, caminos y áreas industriales. La Tabla I.1.1 muestra algunos de los usos de distintos productos químicos que se han utilizado a lo largo de la historia para combatir plagas, así como el hecho de que a partir de los años 20 haya aumentado la preocupación de la población por el uso indiscriminado de los mismos (Gavrilescu, 2005).

Pese a que los beneficios obtenidos a partir del uso de plaguicidas son numerosos, la utilización a escala mundial de grandes cantidades de estos compuestos ha dado origen a un conjunto de problemas que afectan al medio ambiente y a la salud humana. De hecho, el uso continuado e incontrolado de los plaguicidas, así como la elevada persistencia de muchos de ellos en el medio ambiente, ha provocado la aparición de problemas que inciden directamente sobre

la salud humana y la supervivencia de numerosas especies. En este sentido, es posible encontrar residuos de plaguicidas en frutas, verduras, aguas, suelos, etc. como consecuencia de su utilización en actividades agrícolas, industriales y domésticas.

Tabla I.1.1 Evolución histórica en el uso de distintos productos químicos utilizados para combatir plagas (Gavrilescu, 2005).

Período de la Historia	Producto químico
Año 1000 a. de C.	Azufre como fumigante, empleado por los chinos y griegos; arsenicales para el control de roedores y otras plagas, utilizados por los romanos; cenizas de madera como insecticidas; compuestos de mercurio y arsénico para combatir pulgas y otras plagas del cuerpo humano
Siglo XVI	Aceite de ballena de baja calidad mezclado con vinagre como insecticida para el arroz, utilizado por los japoneses
Siglo XVII	Extractos de hoja de tabaco, como insecticida
Siglo XIX	Insecticidas naturales extraídos de plantas y flores; uso de arsenicales y compuestos de mercurio; uso del caldo bordelés (sulfato de cobre, cal y agua) para combatir el moho de la vid
Primera Guerra Mundial	Ácido sulfúrico (10%) para eliminar las malas hierbas de las dicotiledóneas; amplio desarrollo de la industria agroquímica a partir de la aparición de los primeros plaguicidas de síntesis (insecticidas de segunda generación)
Década de los 20	Uso indiscriminado de distintas formulaciones químicas y gran preocupación pública por el hecho de encontrar residuos en frutas y vegetales
Segunda Guerra Mundial	Continuo aumento del uso de los plaguicidas en la agricultura y salud pública. Utilización extensa de los mismos para el control de insectos y prevención de enfermedades tales como tifus, cólera, malaria, etc.
Década de los 90	Aparición de más de 23.400 plaguicidas registrados por la EPA* (utilización de más de 600.000 toneladas de plaguicidas en la agricultura, industria, organizaciones gubernamentales, hogares, etc.)
En la actualidad	Existencia de más de 100.000 formulaciones diferentes de plaguicidas utilizadas, de las cuales la gran mayoría son de uso agrícola (utilización de más de 4 millones de toneladas de plaguicidas en distintos campos, fundamentalmente el agrícola)

* EPA: Agencia de Protección Medioambiental de los Estados Unidos (<http://www.epa.gov>).

Por todo ello, resulta de vital importancia conocer los riesgos y la toxicidad de estos compuestos, así como asegurar su aplicación correcta (siguiendo las pautas de seguridad establecidas, aplicando las dosis adecuadas y respetando los tiempos de seguridad indicados), de manera que el alimento llegue al consumidor con mínimos riesgos para su salud. Sin embargo, no siempre se llevan a cabo estas indicaciones y, si no existe un control apropiado, los alimentos pueden llegar al consumidor con niveles de plaguicidas más elevados de los que deberían contener. Como consecuencia, se hace muy necesario su análisis, especialmente en alimentos, con el fin de asegurar su consumo seguro.

Ante la problemática originada por el uso de plaguicidas de forma abusiva e incontrolada, en los últimos años se han ido desarrollando nuevos medios de protección de los cultivos de nulo o escaso impacto ambiental. Las líneas actuales de trabajo se centran en incorporar nuevas formulaciones en la lucha química que, por otro lado, es ahora dirigida y aconsejada por expertos, así como en desarrollar estrategias de control (como por ejemplo, la lucha biológica y el control integrado de cultivos), más racionales y respetuosas con el medio ambiente (Barba y Oliva, 2003). Las nuevas tendencias en la lucha química tienen como objetivo principal la producción de compuestos con una alta selectividad (por su propia naturaleza o por otros aspectos del tratamiento, como pueden ser la técnica empleada, el momento de la intervención y la persistencia del producto), una gran efectividad empleando menores dosis y sin efectos secundarios sobre organismos útiles (compuestos con actividad biológica) y persistencia baja o inexistente en el medio ambiente.

El control biológico de plagas es el método que produce menos daños ecológicos; sin embargo, por su acción más lenta, menos efectiva y por la complejidad de los trabajos de investigación y desarrollo, no ha podido competir con la lucha química de elevada toxicidad pero de acción rápida y altamente efectiva. En general, el control biológico de plagas se basa en la utilización, por parte del hombre, de enemigos naturales (especies que se alimentan de los parásitos dañinos de las plantas), con objeto de reducir la población de la plaga a un nivel que no produzca daños económicos importantes.

En lo que respecta a la lucha integrada, a diferencia de la lucha química tradicional donde el principal objetivo es la eliminación total de la plaga, el sistema integrado tiene como meta considerar el hábitat y la dinámica poblacional de las especies en cuestión, para así utilizar todas las técnicas y métodos apropiados de forma compatible, con objeto de mantener las plagas a niveles que no originen daños económicos, de manera que no se dañe el medio ambiente ni se ponga en peligro la salud humana. Combina la lucha química y biológica, con controles genéticos, etológicos, mecánicos y físicos e, incluso, el uso de plantas trampa.

1.1.2 Denominación y clasificación

El término plaguicida o pesticida hace referencia a un conjunto de productos de diversa composición y propiedades, pero con un fin común, el combatir las plagas. Según el *Codex Alimentarius* (comisión creada en 1963 por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, FAO, y la Organización Mundial de la Salud, OMS, ambas pertenecientes a la ONU), se define plaguicida o pesticida como *“cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir, repeler o mitigar cualquier plaga de los cultivos, incluidos los vectores de enfermedades humanas o de animales y las especies no deseadas en plantas o animales que causen perjuicio o interfieran de cualquier forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera, productos de la madera o alimentos para animales, o aquellos que puedan administrarse a los animales para combatir ectoparásitos”*. En esta definición quedan incluidas también las sustancias reguladoras del crecimiento de las plantas, los defoliantes y los desecantes. Los productos fertilizantes, aditivos alimentarios, fármacos y nutrientes de origen vegetal o animal quedan excluidos.

Establecer una única clasificación para los plaguicidas es bastante complicado, ya que constituyen un grupo de compuestos muy amplio y heterogéneo. En la actualidad, los plaguicidas pueden clasificarse atendiendo a diversos criterios: origen, naturaleza química, época de aplicación, toxicidad, estabilidad, ámbito de aplicación, grado de penetración, etc. Por ejemplo,

atendiendo al ámbito de aplicación al que están destinados, los plaguicidas se pueden clasificar en: acaricidas, alguicidas, antibióticos, avicidas, bactericidas, defoliantes, desinfectantes, fumigantes, fungicidas, herbicidas, insecticidas, larvicidas, molusquicidas, nematocidas, oxicidas, pisticidas, repelentes y raticidas (EPA, <http://www.epa.gov/pesticides/about/types.htm>). Si se tiene en cuenta su vida media, los plaguicidas se clasifican en permanentes (vida media indefinida), persistentes (de varios meses a 20 años), moderadamente persistentes (de 1 a 18 meses) y no persistentes, con una vida media de días hasta 12 semanas (Ramírez y Lacasaña, 2001).

Otro parámetro que también ha sido considerado para la clasificación de plaguicidas es la dosis letal, DL_{50} , que se define como la cantidad mínima de una sustancia, generalmente expresada en mg de sustancia/kg de peso del animal, capaz de provocar la muerte de un 50% de animales de prueba (generalmente ratas). Los resultados de DL_{50} obtenidos proporcionan una orientación sobre la toxicidad aguda del producto en su utilización y al basarse en la observación de especies animales, es importante señalar que estos indicadores no proporcionan información sobre los efectos crónicos ni sobre la citotoxicidad de algún compuesto. En base a los valores de DL_{50} , la OMS realiza una clasificación de los plaguicidas en función de su toxicidad, vía de contacto (oral y tópica) y formulación del producto (sólido o líquido) en: extremadamente tóxicos, altamente tóxicos, moderadamente tóxicos y ligeramente tóxicos, ver Tabla I.1.2.

Independientemente de su clasificación, en la actualidad existen cerca de 1.500 principios activos de plaguicidas y unas 100.000 formulaciones o preparados comerciales de los mismos (Orozco y col., 2003).

I.1.3 Efectos de los plaguicidas sobre el medio ambiente

Los plaguicidas han sido utilizados con fines diversos, tal como puede observarse en la Tabla I.1.3. La agricultura es la actividad que más emplea este tipo de compuestos, consumiendo el 85% de la producción mundial, con el fin de

controlar químicamente las diversas plagas que merman la cantidad y calidad de las cosechas (Al-Saleh, 1994).

Tabla I.1.2 Clasificación de los plaguicidas recomendada por la OMS (OMS, 2004).

Clasificación	DL ₅₀ en ratas (mg/kg de peso del animal)			
	Vía oral		Vía tópica	
	Sólidos	Líquidos	Sólidos	Líquidos
Extremadamente tóxicos	≤ 5	≤ 20	≤ 10	≤ 40
Altamente tóxicos	5-50	20-200	10-100	40-400
Moderadamente tóxicos	50-500	200-2.000	100-1.000	400-4.000
Ligeramente tóxicos	>500	>2.000	>1.000	>4.000

En Europa se utilizan actualmente cerca de 320.000 toneladas de plaguicidas (Informe Eurostat, 2007), muchos de los cuales presentan una elevada toxicidad, persistencia y movilidad medioambiental, convirtiéndolos en uno de los grupos de compuestos contaminantes más importantes. La peligrosidad de estos compuestos puede afectar tanto a las personas implicadas en su fabricación y formulación, como al agricultor que está en contacto con ellos, al medio ambiente y al ser humano en general. Así, se han detectado residuos de plaguicidas en multitud de alimentos, aguas, suelos y fluidos biológico, entre otros (Berrada y col., 2003).

En general, los plaguicidas son considerados contaminantes ambientales debido a su toxicidad, estabilidad, persistencia y a su capacidad de bioacumulación en la cadena trófica, propiedades que dan lugar a la contaminación de aguas, suelos y aire, además de producir determinados efectos secundarios en diversos sistemas biológicos (plantas, animales y humanos), ya que los residuos de estos compuestos pueden llegar a zonas alejadas del área de aplicación arrastrados por el viento, por cursos de aguas continentales o de corrientes marinas y a través de la cadena trófica (Figura I.1.1).

Tabla I.1.3 Usos más frecuentes de los plaguicidas (Ramírez y Lacasaña, 2001).

Actividad	Uso
Agricultura	Control de las múltiples plagas que afectan las cosechas en cualquiera de sus etapas
Salud pública	Control de vectores de enfermedades como malaria, peste, fiebre amarilla, tífus, etc. Control de plagas (roedores) y erradicación de plantaciones cuyo producto final sea droga ilícita
Ganadería y cuidado de animales domésticos	Desinfección de ganado ovino y de animales domésticos como perros y gatos
Tratamiento de estructuras	Tratamiento de edificios públicos y privados, oficinas, hospitales, hoteles, cines, teatros, restaurantes, escuelas, etc. y en la industria ferroviaria y de navegación marítima y aérea
Mantenimiento de áreas verdes	Tratamiento de parques, jardines, áreas de recreo, campos de golf y autopistas, vías férreas, andenes, torres con líneas de alta tensión y postes
Mantenimiento de reservas de agua	Tratamiento de grandes reservas de agua, naturales o artificiales, presas, embalses, diques, depósitos, estanques piscícolas, canales, albercas y piscinas
Industria	Fabricación de neveras, equipos eléctricos, pinturas, resinas, pegamentos, pastas, ceras, líquidos limpiametales, tiendas de campaña, velas para navegación, redes para deporte, tapetes, alfombras y tapices, en la industria de la madera, materiales para embalaje de alimentos, cartón y múltiples productos de papel. En la industria de la alimentación, para la conservación de alimentos frescos como carnes, pescados, etc.
Hogar	Incorporados en productos como cosméticos, champús, jabones y repelentes de insectos. Se usan en el lavado y secado de alfombras, en desinfectantes caseros y en productos para el cuidado de mascotas y plantas, además del uso de insecticidas

El transporte de los plaguicidas tras su aplicación implica varios procesos simultáneos o sucesivos que incluyen emisión, degradación, adsorción/desorción, volatilización, lixiviación, etc. (Logan, 1999; Gavrilesco, 2005). Estos procesos se pueden agrupar en aquellos que afectan a la persistencia (fotodegradación, degradación química, degradación microbiológica) y en los que afectan a la movilidad (adsorción, volatilización, acción del viento, lixiviación). La cantidad de plaguicida que se distribuye en el aire, suelo, agua, plantas y animales va a depender de una serie de factores tales como el método de aplicación, cantidad de producto aplicado, duración, frecuencia y lugar de aplicación, topografía del

terreno, tipo y densidad de vegetación, condiciones del suelo, proximidad de agua, etc.

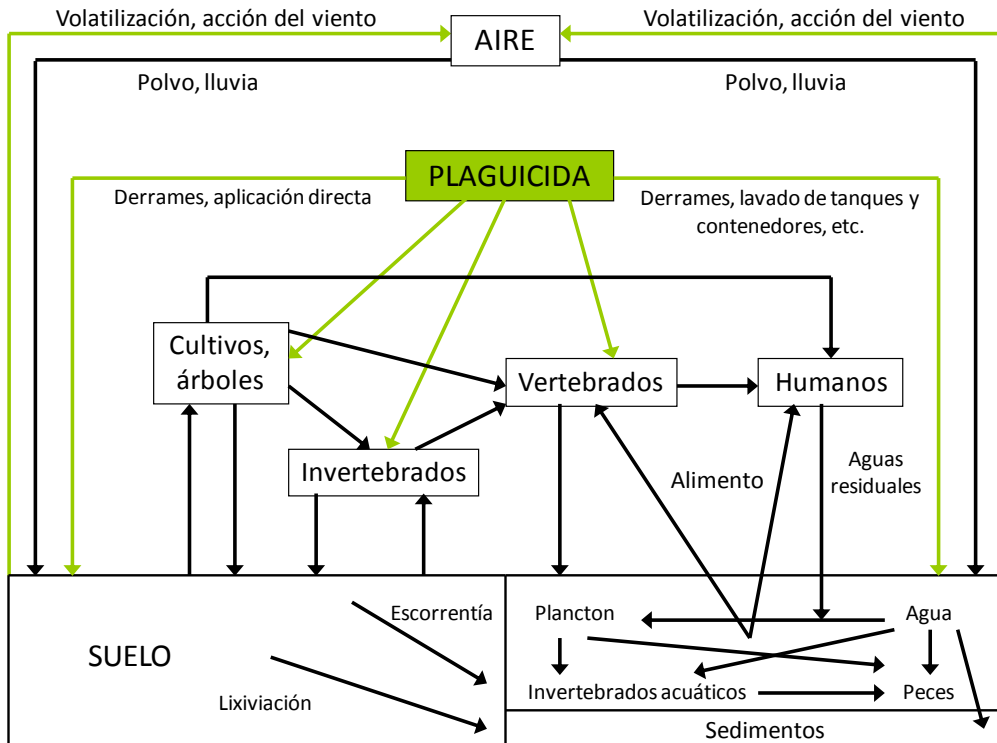


Figura I.1.1 Movimiento de los plaguicidas en el medio ambiente. Adaptado de Gavrilesco (2005).

Los plaguicidas pulverizados se pueden mover a través del aire y pueden acabar en lugares muy lejanos, tanto en el suelo como en el agua. Los que se aplican directamente sobre el suelo, pueden filtrarse a capas basales, reabsorberse posteriormente por otras plantas o bien pasar a las aguas subterráneas. A su vez, los plaguicidas que llegan a las aguas pueden pasar a la atmósfera al evaporarse.

Por tanto, el movimiento de los plaguicidas en el medio ambiente es muy complejo, pudiendo suceder que alguno de estos compuestos llegue a lugares no deseados e incluso que afecte a los depredadores naturales de las plagas, con lo que, en lugar de producir un beneficio, se provoca un daño más elevado.

Como ejemplo, cabe destacar un estudio llevado a cabo por Zumbado y col. (2004), en el que se demuestra que, después de años de aplicación de ciertos plaguicidas organoclorados (tales como el DDT, y su principal metabolito, el 1,1-dicloro-2,2-bis(4-clorofenil)etileno, DDE), éstos pasan al ser humano a través de la cadena trófica, de manera que es posible su detección en el suero humano. De hecho, según este estudio, un 40% de la población canaria presenta niveles apreciables de DDT en su sangre, plaguicida prohibido desde hace décadas. Esto podría justificarse fundamentalmente por su elevado uso durante las décadas pasadas, aunque también se puede considerar el hecho de que estos plaguicidas hayan sido transportados por los vientos Alisios desde Marruecos, donde este insecticida se sigue empleando, tal como ha ocurrido en otras regiones del mundo (Fries, 1995). Sin embargo, no existe ningún trabajo publicado en el que se haya evaluado la presencia de DDT en partículas en suspensión en el aire de esta región.

El movimiento de los plaguicidas en el medio ambiente, junto con algunas de sus propiedades tales como toxicidad, estabilidad, persistencia y bioacumulación, constituyen una de las causas principales de contaminación de los sistemas bióticos (microorganismos, animales y plantas) y abióticos (suelo, aire y agua), amenazando su estabilidad y representando un peligro para la salud pública, de manera que los daños que se produzcan en cualquiera de los organismos de un ecosistema originarán alteraciones en el mismo. Por ejemplo, uno de los efectos más importantes de los plaguicidas sobre el sistema biótico es la muerte de todos o parte de los microorganismos que forman el plancton, dañando la base de las redes tróficas, con el consecuente perjuicio para el resto del ecosistema (Favari y col., 2002). En lo que respecta a las plantas, muchos de estos productos causan efectos en la germinación de las semillas, en el desarrollo vegetativo, en el valor alimenticio y calidad comercial del producto, etc. (Hanley y Whiting, 2005).

Aunque los plaguicidas tienen sin duda efectos en la superficie terrestre, el principal medio a partir del cual se producen mayores daños ecológicos es el agua de escorrentía contaminada con plaguicidas. Muchos plaguicidas o sus productos de transformación que se encuentran en el aire y el suelo, llegan eventualmente a los ecosistemas acuáticos y una vez en ellos, pueden ser degradados parcial o

totalmente, permanecer sin cambios, regresar a la atmósfera por volatilización, o bioconcentrarse en los organismos de dichos ecosistemas. Los efectos adversos de los plaguicidas en los ecosistemas acuáticos dependen no sólo de sus características y concentración, sino también de la naturaleza del ecosistema. Los principales efectos ocurren, de manera directa, sobre los sedimentos y las distintas formas de vida acuática (peces, plancton e invertebrados acuáticos) e indirectamente sobre el resto de animales e incluso el ser humano. La presencia de residuos de plaguicidas en el medio acuático se ha comprobado en numerosos trabajos científicos (Fleeger y col., 2003; Tremolada y col., 2004; Li y col., 2008).

Las aves y los mamíferos también pueden verse afectados por los plaguicidas (Mineau, 2005; Hela y col., 2006). Dado que estos compuestos suelen ser solubles en grasas (sobre todos los organoclorados), tienen un mayor efecto sobre los animales que las almacenan como fuente de energía. Al igual que en los organismos acuáticos, además de poder causar la muerte, los plaguicidas tienen efectos adversos en las aves y en los mamíferos, sobre todo en su capacidad de reproducción.

Otro hecho de gran importancia es el que los plaguicidas también pueden causar perjuicios sobre los depredadores naturales de las plagas, con lo que desaparece el control natural preexistente. A su vez, otros insectos que antes no constituían plaga alguna, pueden llegar a serlo al desaparecer predadores y competidores. Los polinizadores también se ven afectados por la presencia de plaguicidas, comprometiendo con ello el éxito reproductivo de gran variedad de plantas que necesitan de su concurso para reproducirse.

1.1.4 Efectos de los plaguicidas sobre la salud humana

La salud humana puede verse perjudicada por la exposición directa o indirecta a los plaguicidas. En lo que respecta a la exposición directa, la actividad agrícola es la fuente principal tanto para los operarios que aplican los plaguicidas como para los trabajadores de la industria química fabricante de los mismos y, en general, para todos aquellos que formulan, manufacturan, mezclan, transportan,

cargan, almacenan o aplican plaguicidas (Al-Saleh, 1994). El nivel de exposición y la probabilidad de intoxicaciones agudas en estos grupos son sustancialmente mayores por el contacto continuo y estrecho con los compuestos químicos. A pesar de que los períodos de contacto con el agente son relativamente cortos, no dejan de ser intensos y repetitivos durante la jornada de trabajo, provocando efectos tóxicos que varían en función del tipo y la cantidad de plaguicida al que se estuvo expuesto, siendo relativamente infrecuentes los episodios de tipo accidental o intencional.

En cuanto a la exposición a plaguicidas de manera indirecta, son diversos los tipos de plaguicidas que en períodos prolongados, desde múltiples fuentes y a dosis bajas penetran en el organismo utilizando distintas vías. La vía principal es ingestión de sustancias que contengan este tipo de compuestos, sobre todo alimentos contaminados de origen vegetal (frutas, verduras, cereales, leguminosas, etc.) o animal (carne bovina, porcina y sus derivados, pescado, productos lácteos, huevo, etc.) y aguas. Incluso la leche materna y la placenta pueden ser vías de transmisión de plaguicidas (Campoy y col., 2001; Shen y col., 2007). En general, los plaguicidas que se suelen transmitir a través de la leche materna son los organoclorados, los cuales se encuentran acumulados en el tejido adiposo de la madre como consecuencia de diversos factores (dieta, consumo de pescado, hogar y/o trabajo, consumo de tabaco, etc.).

Los efectos tóxicos de los plaguicidas sobre la población humana han sido motivo de preocupación durante muchos años, lo cual ha producido un crecimiento exponencial de las publicaciones científicas al respecto, incluidas aquellas relacionadas con su monitorización y distribución en el medio. Sin embargo, hasta el momento se conoce poco acerca de los mecanismos de toxicidad de la mayoría de los plaguicidas en humanos, puesto que son de diversos tipos y cada uno de ellos posee un mecanismo de acción distinto (Ferrer, 2003). En cualquier caso, los plaguicidas pueden entrar en el cuerpo humano por vía dérmica, oral o respiratoria, originando dos grados distintos de toxicidad: crónica (derivada de una exposición prolongada a plaguicidas en dosis muy bajas y provocada generalmente

por la ingestión de alimentos que los contienen) y aguda (causada accidentalmente en su manipulación o aplicación, o bien por intentos suicidas).

En general, los plaguicidas actúan en el cuerpo humano disolviéndose en la membrana lipídica que rodea a las fibras nerviosas, interfiriendo en el transporte de iones a su través, modificando la acción de algún enzima del metabolismo, etc. (Banerjee y col., 1999; Patil y col., 2003). Algunos productos que tienen acción cancerígena sobre humanos, son normalmente sustancias lipófilas, que se depositan principalmente en el tejido graso y de manera decreciente en el hígado, músculo, bazo y sangre. Otro efecto observado es que se van concentrando en el tejido animal según se asciende en la cadena trófica, de forma que los consumidores primarios (hervíboros) presentan una baja concentración en sus órganos, los carnívoros más elevada, y aquellos que se sitúan en la cúpula de la pirámide llegan a tener concentraciones muy elevadas de plaguicidas. Este efecto de bioacumulación puede causar graves perjuicios en el hombre.

En la Tabla I.1.4 se muestran los efectos tóxicos más importantes producidos por los plaguicidas más comúnmente utilizados (organoclorados, organofosforados, carbamatos y piretroides). Todos estos problemas derivados de la toxicidad de los plaguicidas en el ser humano son particularmente graves en los países subdesarrollados o en vías de desarrollo, donde el uso de plaguicidas es tan común como las carencias nutricionales que presentan. Las condiciones de vida en la mayoría de estos países hacen prácticamente imposible garantizar un uso adecuado de los plaguicidas. La disponibilidad de estos productos, la falta de información sobre sus peligros, las políticas gubernamentales y el mercadeo agresivo por parte de la industria, así como la pobreza, el analfabetismo y la falta de servicios de salud en áreas rurales aseguran que los plaguicidas sean una seria amenaza para la seguridad alimentaria, la salud y el ambiente.

I.1.5 Legislación

Cada vez es mayor la inquietud de la sociedad por la calidad toxicológica de los alimentos y las aguas y, más concretamente, por los niveles de residuos de

compuestos tóxicos, entre ellos los residuos de plaguicidas. El *Codex Alimentarius* entiende por residuo de plaguicida o pesticida a “*toda/s sustancia/s específica/s, tóxica/s o contaminante/s, presente/s en alimentos, productos agrícolas o alimentos para animales, como consecuencia del uso de un plaguicida*”. (FAO/OMS, <http://www.codexalimentarius.net>; <http://www.fao.org>). Por tanto, esta definición incluye no sólo los restos del plaguicida en su forma molecular original, sino también a cualquiera de sus derivados, productos de conversión, metabolitos, productos de reacción e impurezas de importancia toxicológica.

Tabla I.1.4 Efectos tóxicos de algunos de los grupos de plaguicidas más utilizados (Plenge-Tellechea y col., 2007).

Familia	Efecto tóxico	Referencia
Organoclorados	Toxicidad extrema. Efectos negativos sobre el sistema endocrino, además de ser potencialmente mutagénicos y carcinogénicos. Afectan al sistema nervioso y se acumulan en el tejido graso.	Longnecker y col., 1997; Kester, 2001
Organofosforados	Afectan al sistema nervioso, concretamente a las terminales nerviosas a nivel enzimático. Toxicidad elevada. Absorción rápida por las vías respiratorias y por la piel, así como por medio de la ingestión.	Jeyaratman y Maroni, 1994; Weiss y col., 2004
Carbamatos	Afectan a las terminales nerviosas a nivel enzimático. Elevada toxicidad y rápida distribución por el torrente sanguíneo.	Weiss y col., 2004
Piretroides	Alteraciones en el sistema nervioso e inmunológico. Alteraciones en la piel (reacciones alérgicas y dermatitis).	Ferrer, 2003; Soderlund y col., 2007

Los residuos de plaguicidas afectan tanto a la salud pública como al comercio, ya que su presencia, además de constituir un riesgo para la salud de los consumidores, constituye también una barrera que limita la comercialización de productos en los mercados internacionales. De este modo, se han convertido en uno de los problemas ambientales y sanitarios que más interés despierta entre los consumidores de todo el mundo y actualmente recibe un gran esfuerzo investigador en todos los campos.

Como consecuencia, los organismos oficiales internacionales deben regular las concentraciones máximas admisibles de plaguicidas en los productos agroalimentarios y también en las aguas, especialmente en las superficiales y subterráneas, puesto que son las que más se utilizan para el consumo humano. En este sentido, el *Codex Alimentarius* define también el límite máximo de residuos (LMR) como *“la concentración máxima de residuos de un plaguicida (expresada en mg/kg) para que se permita legalmente su uso en la superficie o en la parte interna de los productos alimenticios para consumo humano y de piensos”*. Los LMRs se basan en datos de buenas prácticas agrícolas (BPA) en el uso de plaguicidas, que a su vez se definen como *“los usos inocuos autorizados a nivel nacional, en las condiciones existentes, de los plaguicidas necesarios para un control eficaz y fiable de las plagas”*. Por tanto, los LMRs tienen por objeto lograr que los alimentos derivados de productos básicos que se ajustan a sus respectivos LMRs sean toxicológicamente aceptables. En definitiva, estos valores permiten controlar el uso de plaguicidas, facilitar el comercio y proteger al consumidor.

Por todo ello, es necesario llevar a cabo controles periódicos (programas de monitorización) del contenido de plaguicidas y sus residuos de los productos agroalimentarios y de las aguas naturales destinadas al consumo humano y animal, con la finalidad de verificar que estén exentos de los mismos o bien que la concentración de estos compuestos sea inferior al LMR establecido por las distintas legislaciones, con objeto de incrementar la seguridad alimentaria.

La Unión Europea (UE), por su parte, aplica un conjunto de medidas encaminadas a reducir los riesgos para el medio ambiente y la salud humana vinculados a la utilización de los plaguicidas y, de manera más general, a lograr un empleo más sostenible de los plaguicidas y una reducción global sensible de los riesgos y la utilización, sin pérdida de rendimiento para los usuarios profesionales (http://ec.europa.eu/food/plant/protection/index_es.htm). Las medidas aplicadas tienen por objeto la intensificación de la vigilancia y la investigación sobre los plaguicidas, así como la formación y la información de los usuarios, a través de medidas específicas de utilización de estas sustancias.

I.1.5.1 Legislación en aguas en el marco de la Unión Europea

Dentro de la política comunitaria de medio ambiente de la UE, la protección de las aguas ocupa un espacio amplio y consolidado, con un considerable grado de desarrollo legislativo. En la actualidad, el marco comunitario para la protección y la gestión de las aguas tiene como eje fundamental la denominada Directiva Marco de Aguas (DMA, Directiva 2000/60/CE). Mediante esta directiva marco, la UE organiza la evaluación, vigilancia y gestión de las aguas superficiales, continentales, de transición, aguas costeras y subterráneas en relación con su condición ecológica y química, con el fin de prevenir y reducir su contaminación, fomentar su uso sostenible, proteger el medio acuático, mejorar la situación de los ecosistemas acuáticos y paliar los efectos de las inundaciones y de las sequías (<http://europa.eu/scadplus/leg/es/lvb/l28002b.htm>). La implantación legal de la DMA en la legislación nacional española se realizó el 30 de diciembre de 2003 por medio del artículo 129 de la Ley 62/2003, de medidas fiscales, administrativas y de orden social, que modificó el texto refundido de la Ley de Aguas, aprobado por Real Decreto Legislativo 1/2001, del 20 de julio.

La DMA está conformada por numerosas normas, entre las que destacan:

- Directiva 98/83/CE del Parlamento Europeo y del Consejo sobre la calidad de las aguas destinadas al consumo humano.
- Directiva 91/271/CEE del Consejo sobre el tratamiento de aguas residuales urbanas. Establece obligaciones sobre la depuración de las aguas. Es el pilar básico que orienta los ingentes esfuerzos en la construcción de depuradoras realizados en los últimos quince años.
- Directiva 2006/7/CE del Parlamento Europeo y del Consejo sobre la calidad de las aguas de baño.
- Directiva 2006/118/CE del Parlamento Europeo y del Consejo sobre aguas subterráneas, centrada en particular en cuestiones relacionadas con la calidad.
- Decisión 2455/2001/CE del Parlamento Europeo y del Consejo por la que se adopta la lista de 33 sustancias prioritarias peligrosas, al identificar las

sustancias químicas peligrosas que necesitan de un control específico y al establecer los objetivos de calidad para las mismas.

El control de la contaminación del agua por plaguicidas constituye uno de los ámbitos de actuación más importantes incluidos en la legislación de la UE. De hecho, existe una legislación muy restrictiva en materia de plaguicidas en aguas potables: de acuerdo con la directiva 98/83/CE del Parlamento Europeo y del Consejo sobre la calidad de las aguas destinadas al consumo humano, la concentración máxima admisible de plaguicidas en agua potable debe ser de 0,1 µg/L por plaguicida individual y de 0,5 µg/L para la suma de compuestos. Este nivel restrictivo no atiende a consideraciones de toxicidad de los compuestos, sino al hecho de que estas sustancias no deben estar presentes en el agua de uso público. Por tanto, estos bajos niveles permitidos por la UE obligan a desarrollar metodologías analíticas altamente selectivas y sensibles para su determinación en aguas de consumo humano.

1.1.5.2 Legislación en alimentos en el marco de la Unión Europea

La UE y la industria fitosanitaria comparten el objetivo de mantener una agricultura sostenible en Europa que, además, contribuya a lograr unos estándares elevados con respecto a la salud pública y a la seguridad medioambiental. La legislación europea en materia de plaguicidas regula de manera estricta la comercialización y la utilización de estos productos, así como la presencia de sus residuos en alimentos. Para ello, la UE ha fijado los niveles máximos de residuos de plaguicidas en los alimentos (LMRs), con objeto de proteger al consumidor.

Hasta el 1 de septiembre de 2008, los residuos de plaguicidas en los alimentos estaban regulados por cuatro Directivas del Consejo de la UE y sus respectivas modificaciones: 76/895/CEE, que establece LMRs para determinadas frutas y vegetales; 86/362/CEE, que establece LMRs para cereales y sus productos; 86/363/CEE, que establece LMRs para productos de origen animal y 90/642/CE, que amplía la directiva 76/895/CEE y que establece LMRs en productos derivados de vegetales, incluyendo frutas. Esta última directiva fue complementada

posteriormente con la directiva 97/41/CE. Sin embargo, estas normas eran complejas. Para algunos plaguicidas, la Comisión fijaba los LMRs, mientras que para otros, los Estados miembros eran los responsables, pudiendo fijar LMRs más altos. Incluso para determinados plaguicidas, no había ningún LMR. Como consecuencia, los comerciantes y los importadores, que debían utilizar 27 listas de LMRs nacionales, padecieron la confusión respecto a los LMRs que debían respetar. Para los consumidores, la confusión acarreó temores respecto a la seguridad de los residuos de plaguicidas, particularmente en el caso de que el alimento excediera los LMRs de un Estado miembro y fuera aceptable en otros Estados miembros.

El nuevo reglamento, aplicable desde el 1 de septiembre de 2008 (Reglamento CE nº 396/2005), constituye una única legislación a escala comunitaria relativa a los LMRs de plaguicidas en todos los productos agrícolas destinados a la alimentación humana y a piensos animales, estableciendo una lista de LMRs para 315 productos frescos. Estos LMRs se aplican también a dichos productos después de su transformación, teniendo en cuenta las operaciones de dilución o de concentración durante los tratamientos. Además, el reglamento se refiere a los plaguicidas utilizados actual o previamente en la agricultura dentro o fuera de la UE, de manera que si un plaguicida no se menciona específicamente, se aplica un LMR general por defecto de 0,01 mg/kg (http://ec.europa.eu/food/plant/protection/pesticides/index_en.htm). Por tanto, el texto elimina las diferencias entre los LMRs nacionales de los diferentes países de los Estados miembros, facilitando el funcionamiento del mercado interior, así como con terceros países.

Por otro lado, el nuevo reglamento hace referencia a la seguridad de todos los grupos de consumidores incluyendo, entre otros, los bebés, los niños y los vegetarianos. La evolución de seguridad de los consumidores incumbe a la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (AESA), según la toxicidad del plaguicida, los niveles máximos esperados en los alimentos y las diversas dietas de los consumidores europeos. El reglamento establece claramente el cometido de los Estados miembros, de la AESA y de la Comisión en la determinación de los LMRs y contiene:

- Los LMRs de la UE (cerca de 45.000) ya en vigor antes de septiembre de 2008.
- Los LMRs recientemente armonizados fijados previamente por los Estados miembros (cerca de 100.000).
- Una lista de sustancias de bajo riesgo para las cuales no son necesarios los LMRs.

Los agricultores, comerciantes e importadores son responsables de la seguridad alimentaria, incluida la conformidad con los LMRs, mientras que las autoridades de los Estados miembros son responsables del control y de la aplicación de los LMRs. Para asegurarse de que esto se realice de manera adecuada y uniforme, la Comisión dispone de tres instrumentos:

- El programa plurianual de control coordinado de la UE, que establece para cada Estado miembro las combinaciones principales de plaguicidas para cosechas que deben ser supervisadas y el número mínimo de muestras que deben tomarse. Los Estados miembros deben comunicar los resultados que se publican en un informe anual.
- Los laboratorios comunitarios de referencia que coordinan, forman al personal, desarrollan métodos de análisis y organizan pruebas para evaluar las competencias de los diversos laboratorios nacionales de control.
- La oficina alimentaria y veterinaria de la Comisión, que realiza inspecciones en los Estados miembros para evaluar y revisar sus actividades de control. Si se encuentran residuos de plaguicidas a niveles preocupantes para los consumidores, el sistema de alerta rápida para alimentos y piensos (RASFF) transmite la información y se adoptan medidas para la protección de los consumidores.

En España, tras su incorporación en la UE, y después de aplicarse diferentes órdenes y decretos que regulaban este tipo de productos (como por ejemplo, el Real Decreto 3349/1983) se publicó finalmente el Real Decreto 280/1994 de 18 de febrero, que establece los LMRs de plaguicidas y su control en determinados productos de origen vegetal, lo que supuso la incorporación al ordenamiento

jurídico interno de las diferentes directivas comunitarias, entre ellas, la directiva 90/642/CEE.

Por tanto, a la vista de la legislación vigente en lo que a materia de seguridad alimentaria se refiere, se hace necesario el desarrollo de metodologías analíticas fiables, rápidas y compatibles con el medio ambiente, que permitan la determinación de residuos de plaguicidas en un amplio espectro de matrices, a nivel de sus LMRs.

I.1.6 Consumo de plaguicidas en Europa y en España

Junto con otros objetivos de integración de la dimensión medioambiental, tales como calidad y uso equilibrado del agua, disminución de la degradación del suelo, cambio climático y calidad del aire, así como la conservación del paisaje y de la biodiversidad, la UE ha establecido nuevas medidas para reducir el riesgo de los plaguicidas en la agricultura (ver sección I.1.4). Según datos recientes de la agencia de estadísticas de la UE (Eurostat) la agricultura es, con diferencia, el sector que más recurre a los plaguicidas (Informe Eurostat, 2007). De hecho, la UE representa actualmente, con una venta anual de aproximadamente 320.000 toneladas de materias activas, una cuarta parte del mercado mundial de plaguicidas. Los principales productos son los fungicidas (casi un 43% del mercado), seguidos por los herbicidas (36%), los insecticidas (12%) y otros plaguicidas en un 9% (<http://europa.eu/scadplus/leg/es/lvb/l21288.htm>).

La Figura I.1.2 muestra los resultados de un estudio estadístico realizado en el año 2003 relativo al consumo estimado de productos fitosanitarios en los Estados miembros de la UE (Informe Eurostat, 2007). Estas estadísticas indican que los países con mayor superficie de cultivo (Francia, España, Italia y Alemania) presentan el mayor consumo de plaguicidas en valores absolutos. Además, si se considera el uso de plaguicidas por hectáreas, Italia, Francia, los Países Bajos y Bélgica destacan como grandes consumidores, lo que pone de manifiesto la agricultura intensiva de estos países y/o las características particulares de las

cosechas que requieren un tratamiento más intensivo (por ejemplo frutales y viñedos).

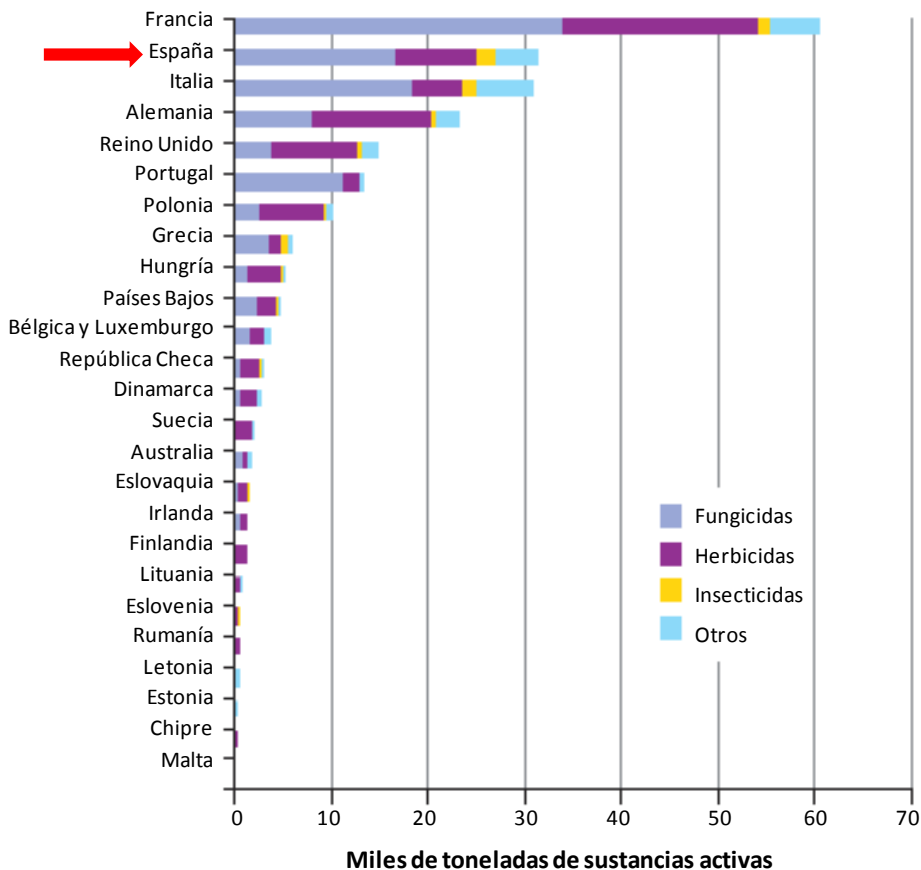


Figura I.1.2 Cantidades estimadas de plaguicidas utilizados en la agricultura en los Estados miembros de la UE en 2003 (Adaptado de Informe Eurostat, 2007).

A partir de los Consejos Europeos de Cardiff y Viena en el año 1998, la UE se planteó tener en cuenta consideraciones ambientales en todas las políticas comunitarias incluida la política agraria. En concreto, se subrayó la importancia de crear indicadores medioambientales para evaluar dicha integración. En España, el Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino (MARM) ha establecido una serie de medidas agroambientales que constituyen el denominado “banco público de indicadores medioambientales”, cuyo objetivo principal es presentar un conjunto de indicadores que contribuyan al conocimiento de los aspectos

ambientales más destacables en la totalidad o en parte del territorio español (http://www.mma.es/portal/secciones/calidad_contaminacion/indicadores_ambientales/banco_publico_ia/), centrándose en cinco ejes de actuación: agua, suelos, riesgos naturales, biodiversidad y paisaje.

En el ámbito de la agricultura, el consumo de plaguicidas o productos fitosanitarios es uno de los indicadores agroalimentarios que figuran en el banco público de indicadores medioambientales, junto con otras medidas como el consumo de fertilizantes, la ecoeficiencia en la agricultura, la agricultura ecológica y la superficie de regadío respecto a la superficie agrícola total. Según datos facilitados por el MARM de España y por la Asociación Empresarial para la Protección de las Plantas (AEPLA, <http://www.aepla.es>), el indicador “consumo de productos fitosanitarios” muestra la cantidad de plaguicidas utilizada al año en la agricultura (fungicidas, herbicidas, insecticidas y otros plaguicidas como los acaricidas, nematocidas, fitoreguladores, molusquicidas y rodenticidas) con relación a la superficie de cultivo. En España, la superficie agrícola se cifra en algo más de 25 millones de hectáreas dedicadas a cultivos y pastos, siendo nuestro país, como ya se ha comentado, el segundo de la UE (después de Francia) por superficie cultivada, ocupando el cuarto lugar (por detrás de Francia, Italia y Alemania) por su aportación a la producción final agrícola de la UE. La superficie agraria a la que se aplican los plaguicidas comprende cultivos herbáceos y cultivos leñosos, quedando excluidos el barbecho y otras tierras no ocupadas así como los prados naturales.

En la Figura I.1.3 se muestran los datos más recientes (correspondientes al período 1990-2006) del indicador “consumo de productos fitosanitarios”, según la AEPLA y el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación de España (MAPA). Como puede observarse, desde 1995 (año en el que se registra un importante descenso) hasta 2004 el uso de plaguicidas en nuestro país experimentó un fuerte incremento rompiendo, así, el notable descenso iniciado a finales de la década de los ochenta y principios de los noventa. En 2005 se produjo una disminución importante (12,6%) en el consumo de estos productos como consecuencia de las condiciones climáticas adversas y del aumento de los costes de producción derivado de la subida del precio del petróleo, incrementándose nuevamente en

2006 en relación con el año anterior (1,6%). Por tanto en líneas generales, el consumo de plaguicidas en la agricultura y la superficie de aplicación muestran una tendencia inversa: más consumo sobre menos superficie.

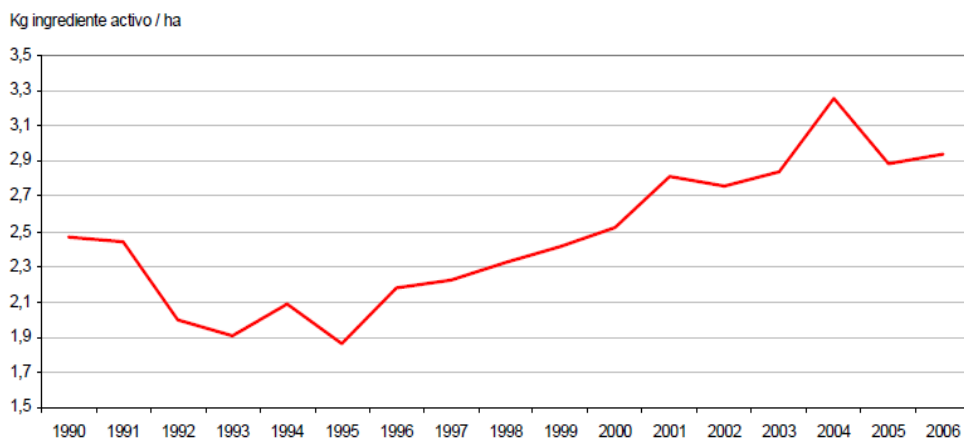


Figura I.1.3 Consumo de plaguicidas en España entre 1990 y 2006 (MARM, http://www.mma.es/portal/secciones/calidad_contaminacion/indicadores_ambientales/banco_publico_ia/pdf/AGRConsumoFitosanitarios.pdf).

Recientemente, según datos de AEPLA, el mercado fitosanitario español ha experimentado durante 2007 un leve crecimiento, que unido al del año 2006, refleja una cierta recuperación, más en valor y precios que en consumo, aunque aún sin compensar el gran descenso del período 2004/2005. En cualquier caso, se debe tener en cuenta que las cifras ofrecidas por AEPLA no representan el 100% del mercado de fitosanitarios en España. De hecho, en base a estudios relativamente recientes, los datos ofrecidos por esta asociación que agrupa a 24 fabricantes supone, aproximadamente, el 77% total del mercado (AEPLA, nota de prensa del 2 de marzo de 2005).

I.1.6.1 Consumo de plaguicidas en las Islas Canarias

El consumo de plaguicidas en las Islas Canarias viene condicionado fundamentalmente por la extensión de la superficie cultivada y por el tipo de agricultura practicada. En lo que a superficie cultivada se refiere, según datos

recientes publicados por el Servicio de Estadística de la Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación del Gobierno de Canarias, la superficie total cultivada en el archipiélago es de 51.867 ha (Estadística Agraria de Canarias, 2006). En la Tabla I.1.5 puede observarse la superficie total, en ha, cultivada en cada una de las Islas Canarias durante el período 2002-2006, así como la superficie total, en ha, de cada isla. A la vista de dicha tabla se deduce que Tenerife es la isla con mayor superficie cultivada, coincidiendo con el hecho de ser la isla del archipiélago con mayor extensión geográfica. Además, la tendencia general en Canarias durante estos cinco años ha sido un aumento en la superficie total cultivada; únicamente durante 2005/2006 se produjo un ligero descenso.

Tabla I.1.5 Superficie geográfica de las Islas Canarias y superficie total cultivada, por islas, durante el período 2002-2006.

Extensión de cada isla (ha)	Superficie total cultivada (ha)				
	2002	2003	2004	2005	2006
Lanzarote (84.600)	4.289	4.630	4.736	4.655	4.396
Fuerteventura (166.000)	335	354	371	396	446
Gran Canaria (156.000)	8.509	9.739	9.796	10.350	10.127
Tenerife (203.400)	24.849	24.236	24.362	23.817	23.820
La Gomera (37.000)	1.545	1.438	1.403	1.382	1.374
La Palma (70.800)	8.757	8.279	8.421	8.312	8.305
El Hierro (26.900)	2.161	2.062	2.104	3.389	3.398
Canarias (744.700)	50.444	50.737	51.192	52.300	51.867

Datos del Instituto Canario de Estadística del Gobierno de Canarias (http://www.gobiernodecanarias.org/istac/estadisticas/php/saltarA.php?mid=/istac/estadisticas/sector_primario/area_09_frame.html).

En lo que respecta a la agricultura practicada en Canarias, muchos de los cultivos son de secano (vid, cereales y papa). Los cultivos de regadío son especializados y están dirigidos a la comercialización en el resto de España; los más extendidos son los del plátano y del tomate. La Figura I.1.4 muestra la distribución de la superficie cultivada en Canarias, según los últimos datos publicados por la Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación del Gobierno de Canarias (Estadística Agraria de Canarias, 2006).

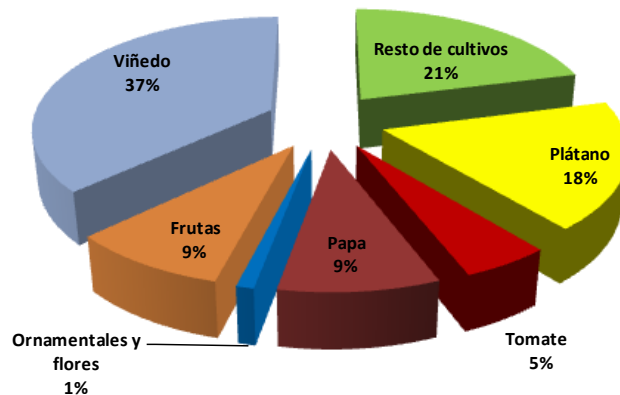


Figura I.1.4 Superficie cultivada en las Islas Canarias en el año 2006 (Estadística Agraria de Canarias, 2006).

Además según esta misma fuente, la producción agrícola en las Islas Canarias varía según el tipo de cultivo, siendo mayoritaria en los cultivos del plátano (30%) y del tomate (15%) (Figura I.1.5).

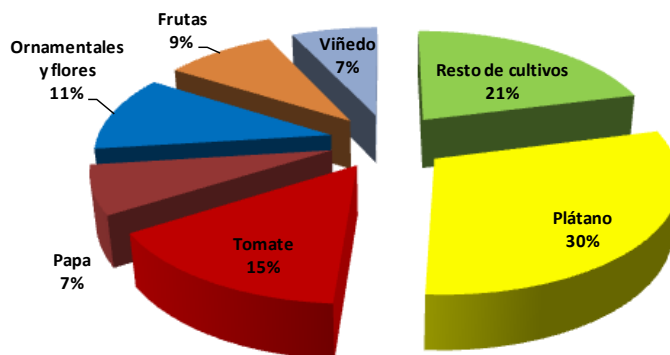


Figura I.1.5 Producción agrícola en las Islas Canarias en el año 2006 (Estadística Agraria de Canarias, 2006).

Las plagas más comunes que afectan a los cultivos mayoritarios de las Islas Canarias son:

- En la vid: fundamentalmente plagas de hongos como mildiu (*Plasmopara vitícola*, Berl y de Toni), botritis (*Botrytis cinerea*, Pers) y oidio (*Uncinula necator*, Burr).

- En el plátano: principalmente plagas de insectos como cochinilla algodonosa (*Dysmicoccus grassi*, Leonardi), picudo negro (*Cosmopolites sordidus*, Germar) y mosca blanca algodonosa (*Aleurodicus dispersus*, Russell y *Lecanoideus floccissimus*, Martin y col.).
- En el tomate: fundamentalmente plagas de hongos como oidio (*Leveillula taurica*, Arnaud), mildiu (*Phytophthora infestans*, Montagne) y botritis (*Botrytis cinerea*, Pers), así como plagas de insectos como mosca blanca (*Trialeurodes vaporariorum*, Westwood y *Bemisia tabaci*, Gennadius) y oruga o larva de *Heliothis* (*Heliothis armigera*, Hübner y *Heliothis Peltigera*, Dennis y Schiffermüller).

Para combatir estas plagas, es bastante común en la agricultura canaria el empleo de plaguicidas, especialmente fungicidas e insecticidas, los primeros sobre todo en el caso de las plagas que afectan al tomate y a la vid y, los segundos, en el caso del plátano. Según los últimos datos publicados por el MARM (año 2006), el consumo de fungicidas e insecticidas en la agricultura canaria fue de 51,49 y 31,58 kg/ha, respectivamente. Los fungicidas más habitualmente empleados en la actualidad pertenecen a distintas familias químicas, entre ellas cabe destacar las pirimidinas, acilalaninas, benzimidazoles, dicarboximidas y triazoles. Por otro lado, los insecticidas de uso más común pertenecen al grupo de los organofosforados y de los carbamatos.

La agricultura en las diferentes Comunidades Autónomas de España presenta una intensificación desigual, lo cual se refleja claramente en el correspondiente consumo de plaguicidas, tal como puede verse en la Tabla I.1.6, elaborada a partir de datos de AEPLA y del MAPA del año 2006. Como se puede observar, la Comunidad Autónoma que presenta mayor consumo de plaguicidas es Canarias (aproximadamente 100 kg/ha), seguida por Cantabria, Murcia, Comunidad Valenciana y La Rioja, con una cifra próxima a los 20 kg/ha. El hecho de que sea Canarias la Comunidad Autónoma con mayor consumo de plaguicidas de toda España está asociado a la intensidad de las prácticas agrícolas desarrolladas en esta región (Zumbado y col., 2004), con objeto de obtener el mayor rendimiento de las cosechas en una superficie poco extensa (agricultura intensiva).

Tabla I.1.6 Consumo de plaguicidas (en kg/ha) por Comunidades Autónomas en 2006.

Comunidad Autónoma	Fungicidas	Herbicidas	Insecticidas	Otros	TOTAL
Andalucía	2,54	2,71	2,90	1,78	9,93
Aragón	0,67	1,20	0,93	0,31	3,11
Asturias	0,85	5,98	2,27	3,02	12,13
Baleares	1,40	0,90	4,71	0,39	7,40
Castilla La Mancha	0,79	0,68	0,74	0,17	2,37
Comunidad Valenciana	3,14	5,45	8,33	3,45	20,38
Castilla y León	0,40	1,33	0,29	0,10	2,12
Canarias	51,49	7,75	31,58	8,93	99,75
Cantabria	4,53	9,33	2,96	6,67	23,49
Cataluña	2,67	2,76	1,94	1,04	8,41
Extremadura	1,22	2,13	2,49	0,29	6,12
Galicia	4,23	2,85	1,22	0,66	8,95
La Rioja	9,70	3,66	4,44	1,10	18,89
Madrid	0,62	4,10	1,02	0,69	6,43
Murcia	5,26	3,54	6,27	6,43	21,50
Navarra	0,80	1,84	0,73	0,40	3,78
País Vasco	3,44	4,72	1,78	1,52	11,45

Datos del MARM (http://www.mma.es/portal/secciones/calidad_contaminacion/indicadores_ambientales/banco_publico_ia/pdf/AGRConsumoFitosanitarios.pdf).

Ante la situación que lleva a Canarias a ser la Comunidad Autónoma con mayor consumo de plaguicidas en su agricultura, la alternativa que se plantea en la actualidad es sustituir la agricultura intensiva por prácticas agrícolas sostenibles, como la agricultura ecológica. Según los últimos datos publicados por el MARM (año 2006), la superficie dedicada a este tipo de agricultura en España ha pasado de las 17.210 ha de 1994 a las 926.390 ha en 2006 (http://www.mma.es/portal/secciones/calidad_contaminacion/indicadores_ambientales/banco_publico_ia/pdf/AGREcolologica.pdf). En lo que respecta a las Comunidades Autónomas españolas, existe un desarrollo desigual; en cifras absolutas, Andalucía ocupa el primer lugar, tanto por la superficie dedicada (537.269 ha) como por el porcentaje de superficie agrícola ecológica en relación con la superficie agrícola útil (11,3%). Canarias ocupa el tercer puesto, con un porcentaje en relación con la superficie agraria útil del 8,1% y una superficie dedicada al cultivo ecológico de 1.012 ha. Este último dato representa un 1,95% de la superficie total cultivada en Canarias. Además, según los últimos datos publicados por la Consejería de Agricultura,

Ganadería, Pesca y Alimentación del Gobierno de Canarias (Estadística Agraria de Canarias, 2006), Tenerife es, con diferencia, la isla con mayor superficie dedicada a este tipo de agricultura (69%). Todo lo contrario sucede en la isla de Lanzarote, con sólo un 1% de superficie dedicada a las prácticas agrícolas ecológicas.

A pesar de que en Canarias cada vez se adoptan más técnicas de agricultura ecológica, la no ecológica sigue predominando en las islas originando, como consecuencia, el uso de grandes cantidades de plaguicidas. Por este motivo y teniendo en cuenta los riesgos que conlleva el uso de este tipo de productos sobre el medio ambiente y el ser humano, es de gran importancia el llevar a cabo estudios relativos a la presencia de plaguicidas en las Islas Canarias en muestras de diversa índole: alimentarias, medioambientales y biológicas.

I.1.7 Estudios realizados en las Islas Canarias

Si bien Canarias es la Comunidad Autónoma española con mayor consumo de plaguicidas en su agricultura, son muy pocos los estudios que se han realizado hasta el momento sobre la presencia de residuos de estos compuestos en productos agroalimentarios de las Islas Canarias, así como su distribución medioambiental (aguas, suelos, etc.) en el archipiélago. En la Tabla I.1.7 se muestra una recopilación de todos estos estudios (únicamente 13), ordenados de manera cronológica.

Como puede observarse en la Tabla I.1.7, hasta ahora estos estudios se han centrado en tres aspectos fundamentales:

- Distribución medioambiental de ciertos plaguicidas, fundamentalmente organoclorados. Concretamente, se ha evaluado su presencia en aguas (Muñoz-Carpena y col., 1998; Proyecto AQUAMAC II, 2007), suelos (Muñoz-Carpena y col., 1998; Ribes y col., 2002; Skrbic' y Durisic'-Mladenovic', 2007) y hojas de pino canario (Villa y col., 2003). En el caso del proyecto AQUAMAC II (2007), también se han determinado carbamatos, triclorobencenos, organofosforados y triazinas en algunas de estas matrices.

Tabla I.1.7 Estudios desarrollados hasta el momento sobre la distribución de plaguicidas en el medio ambiente y en productos agroalimentarios de las Islas Canarias.

Plaguicida	Matriz	Objetivo del estudio	Referencia
Glifosato, metribuzina y productos de transformación	Agua y suelo	Evaluación de la presencia de plaguicidas en acuíferos y suelos. Comparación de métodos de muestreo	Muñoz-Carpena y col., 1998
<i>p,p'</i> -DDE	Huevos de ave (cernícalo)	Evaluación del impacto del <i>p,p'</i> -DDE en la biología reproductiva del cernícalo y en la desaparición de otras rapaces	Mateo y col., 2000
DDT, DDE, HCB*, HCH y pentaclorobenceno	Suelo	Efecto de la temperatura y materia orgánica en la distribución de organoclorados en suelos	Ribes y col., 2002
HCH, HCB*, DDT y sus metabolitos	Hoja de pino canario	Distribución de organoclorados en función del clima, altitud y contaminación local	Villa y col., 2003
Organofosforados y carbamatos	Plasma de lagarto	Inhibición de la enzima butirilcolinesterasa en plasma por acción de plaguicidas	Sánchez-Hernández y col., 2004
<i>p,p'</i> -DDT y <i>p,p'</i> -DDE	Suero humano	Evaluación de la presencia de organoclorados en la población canaria. Comparación entre islas	Zumbado y col., 2004
DDT y sus metabolitos	Suero humano	Evaluación de la presencia de organoclorados en la población canaria. Relación con factores sociodemográficos y geográficos	Zumbado y col., 2005
Lindano, endrín, aldrín y dieldrín	Suero humano	Evaluación de la presencia de organoclorados en la población canaria. Relación con factores sociodemográficos y geográficos	Luzardo y col., 2006
17 organoclorados, 6 carbamatos, 4 organofosforados, 3 triclorobencenos y 7 triazinas	Agua subterránea	Monitorización e investigación de las masas de agua de cara al cumplimiento de la Directiva Marco del Agua en la Macaronesia. Identificación e intensidad de la contaminación	Proyecto AQUAMAC II, 2007
HCB*, HCH, DDT y sus metabolitos	Suelo	Uso de un método quimiométrico para estudiar la distribución de organoclorados en suelos.	Skrbic' y Durisic'-Mladenovic', 2007
Lindano, endrín, aldrín y dieldrín, DDT, metabolitos	Suero humano	Estudio de la asociación entre organoclorados y el factor de crecimiento análogo a la insulina tipo 1	Domínguez-Boada y col., 2007
<i>o,p'</i> -DDT, <i>o,p'</i> -DDE y <i>o,p'</i> -DDD**	Hígado y tejido adiposo de tortuga marina	Evaluación del impacto de organoclorados en tortugas marinas	Monagas y col., 2008
Etoprofos, dimetoto, diazinón, malaoxón, metil-clorpirifos, fenitrotión, malatión, clorpirifos, fenamifos, buprofezin y fosmet	Plátano	Estudio de la presencia de plaguicidas en plátano canario	Hernández-Borges y col., 2009

* Hexaclorobenceno (HCB); ** 1,1-dicloro-2,2-bis (4-clorofenil)etano (DDD).

Además de detectar la contaminación por plaguicidas, el objetivo de estos trabajos ha sido estudiar la distribución de dichos productos en el medio ambiente y relacionarla con factores como la temperatura, cantidad de materia orgánica, clima, altitud y contaminación local.

- Presencia e impacto de plaguicidas en vertebrados de las Islas Canarias: se han realizado estudios en huevos de aves (Mateo y col., 2000), plasma de lagarto (Sánchez-Hernández y col., 2004), suero humano (Zumbado y col., 2004, 2005; Luzardo y col., 2006; Domínguez-Boada y col., 2007) y tejido adiposo e hígado de tortuga marina (Monagas y col., 2008). Al igual que en el caso anterior, la mayor parte de los plaguicidas estudiados son organoclorados (Mateo y col., 2000; Zumbado y col., 2004, 2005; Luzardo y col., 2006; Domínguez-Boada y col., 2007; Monagas y col., 2008), aunque también se han determinado organofosforados y carbamatos (Sánchez-Hernández y col., 2004). En estos trabajos también se ha estudiado el impacto que ocasionan estos plaguicidas en la biología de dichos organismos. A modo de ejemplo, los plaguicidas organofosforados y los carbamatos producen la inhibición de la enzima butirilcolinesterasa en plasma de lagarto, afectando al sistema nervioso central pudiendo provocar la muerte del animal (Sánchez-Hernández y col., 2004). En lo que respecta a la presencia de plaguicidas organoclorados en vertebrados, el uso de este tipo de compuestos produce efectos adversos sobre las poblaciones de aves rapaces canarias, por medio de dos mecanismos: incremento en la mortalidad y fracaso en la reproducción contribuyendo, por tanto, a la extinción de dichos organismos (Mateo y col., 2000). También los plaguicidas organoclorados son una de las causas de mortalidad de las tortugas marinas presentes en las costas canarias (Monagas y col., 2008). En lo que respecta al ser humano, hasta ahora sólo se han realizado 4 estudios sobre la presencia de plaguicidas, concretamente organoclorados (en particular DDT y sus metabolitos: *p,p'*-DDE, *o,p'*-DDE, *p,p'*-DDD y *o,p'*-DDD), en la población del archipiélago canario, estudiando la relación que existe con factores sociodemográficos y geográficos. Los resultados de estos trabajos demuestran que el conjunto de la población canaria presenta unos niveles muy superiores a la media europea y que sigue existiendo una exposición a estos productos en nuestros días, a pesar de haberse prohibido desde 1977 por su elevada

persistencia. Además, según estos estudios, el perfil tipo de la persona expuesta a mayores niveles de estos contaminantes en las Islas Canarias es una mujer, mayor de 20 años, residente en Gran Canaria en un área semiurbana o urbana (Zumbado y col., 2004).

- Residuos de plaguicidas en muestras agroalimentarias de las Islas Canarias: sin duda, éste es el campo menos estudiado. De hecho, existe un único trabajo en la bibliografía referente a la presencia de plaguicidas (principalmente organofosforados) en alimentos, concretamente en plátanos de Canarias. Los resultados de este estudio revelan la presencia de residuos de 5 de los 11 plaguicidas analizados, a niveles inferiores a sus LMRs, excepto uno de ellos, el clorpirifos. Además, y debido al alto porcentaje de muestras en las que aparece este compuesto, se realizó un análisis de la piel y de la pulpa separadamente, con objeto de valorar su distribución, encontrando que la mayor parte del mismo permanece en la piel y penetra muy poco en el fruto (Hernández-Borges y col., 2009).

Por todo lo anteriormente expuesto y a la vista del reducido número de trabajos publicados hasta el momento, es deseable el desarrollo de nuevos estudios que profundicen en el contenido de residuos de plaguicidas en productos de Canarias, entre ellos agua y productos agroalimentarios, por debajo de los LMRs establecidos según la legislación vigente. Ello contribuiría a una mejor evaluación de la distribución medioambiental de los mismos en las islas, así como de una correcta evaluación del consumo de plaguicidas por parte de la población canaria.

1.2 Técnicas cromatográficas y electroforéticas para el análisis de plaguicidas

La elección de una técnica analítica adecuada para la determinación de plaguicidas depende de una variedad de factores incluyendo propiedades de los analitos, efectividad, rapidez, fiabilidad, selectividad y sensibilidad, coste, disponibilidad, compatibilidad con el medio ambiente y capacidad de análisis. En la actualidad, la cromatografía de gases (GC) es la técnica más ampliamente utilizada para el análisis multiresidual de plaguicidas en diversas matrices, dada su elevada

sensibilidad y selectividad en la detección de este tipo de compuestos. Sin embargo, la incompatibilidad de algunos plaguicidas con la GC debido a su inestabilidad térmica, elevado peso molecular, baja volatilidad y/o alta polaridad, hace que muchos de estos compuestos no estén incluidos en los métodos multiresiduo al no poder determinarse fácilmente por GC. Este inconveniente se puede solventar en algunos casos introduciendo una etapa de derivatización previa a la inyección, aunque esta etapa suele ser larga y tediosa e incluso puede conducir a resultados menos precisos. Como consecuencia, se ha incrementado la utilización de técnicas cromatográficas alternativas para la determinación de este tipo de compuestos; es el caso de la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).

A diferencia de la GC, la cromatografía de líquidos (LC) es aplicable a compuestos poco volátiles, altamente polares, termolábiles y/o de elevado peso molecular. Además, esta técnica presenta la ventaja adicional de permitir derivatizaciones pre- y post-columna de los analitos con objeto de mejorar su detección. Sin embargo, la LC lleva asociado el consumo de grandes cantidades de disolventes orgánicos, generalmente tóxicos para el medio ambiente y/o el operador (aunque esto se ha reducido considerablemente con la introducción de la nanocromatografía de líquidos). Además, las longitudes de onda más cortas (próximas a 200 nm) son difíciles de utilizar en HPLC, tanto en régimen isocrático como en gradiente, debido a la gran absorción de la fase móvil, a las impurezas de la misma, al ruido introducido por el flujo y a los efectos relacionados con el índice de refracción de la fase móvil (Taylor y Yeung, 1991).

Aunque la GC y HPLC son las dos técnicas por excelencia más utilizadas en el análisis de plaguicidas (Geerdink y col., 2002; Andreu y Picó, 2004; Tadeo y col., 2004), en los últimos años se han desarrollado ampliamente las técnicas electroforéticas, logrando una popularidad destacada como técnicas analíticas alternativas y complementarias a las cromatográficas. La electroforesis capilar (CE) resulta ventajosa para la separación de plaguicidas con elevadas eficacias, tiempos de análisis cortos y pequeñas cantidades de muestra. Su principal inconveniente es la baja sensibilidad, aunque se ha logrado mejorar considerablemente con el empleo, entre otros, de técnicas de preconcentración en línea y fuera de línea.

En las tres secciones siguientes (I.2.1, I.2.2 y I.2.3) se expondrá el estado actual de las técnicas mencionadas (GC, HPLC y CE) en lo que al análisis de plaguicidas se refiere, puesto que dichas técnicas han sido utilizadas en la presente Tesis Doctoral.

I.2.1 Cromatografía de gases

La incorporación en los años 60 de la GC al análisis de residuos de plaguicidas revolucionó este campo de trabajo, puesto que fue posible separar, simultáneamente, un número importante de plaguicidas, desarrollándose de este modo los métodos multiresiduo. Posteriormente, en los años 70, se introdujo la GC capilar, que con la incorporación de detectores muy sensibles y selectivos, como el de captura de electrones (ECD), el de nitrógeno-fósforo (NPD) y más recientemente el de espectrometría de masas (MS), ha pasado a ser la principal técnica utilizada, especialmente para la determinación de compuestos relativamente volátiles, térmicamente estables y de alta volatilidad (van der Hoff y van Zoonen, 1999; Andreu y Picó, 2004). Entre las ventajas que presenta esta técnica cabe destacar una alta sensibilidad y selectividad, una elevada eficiencia en la separación, versatilidad y sencillez.

En lo que respecta a los detectores que tradicionalmente se han empleado en GC, el ECD y el NPD son los más comunes. El ECD se ha utilizado fundamentalmente para la detección de plaguicidas organoclorados (Moreno-Frías y col., 2001; López y col., 2007), mientras que el NPD se utiliza para plaguicidas nitrogenados y fosforados, siendo bastante común su uso en la detección de plaguicidas organofosforados (Fenoll y col., 2007a; Wang y col., 2008a). Estos detectores son bastante sensibles y selectivos, pero requieren extractos muy limpios por lo cual es necesario efectuar previamente una etapa de limpieza (*clean-up*) adecuada.

El detector selectivo de MS es una excelente alternativa para la determinación e identificación de numerosos plaguicidas de diferentes familias por lo que, en la actualidad, su uso resulta necesario para abordar con garantía el

análisis de residuos de plaguicidas volátiles, apolares y térmicamente estables (Gonçalves y Alpendurada, 2004; Soboleva y col., 2004). El acoplamiento GC-MS, que utiliza en muchos casos como técnica de ionización el impacto electrónico (Andreu y Picó, 2004), no sólo es muy sensible y selectivo, sino que permite la confirmación e identificación de la estructura química de los plaguicidas eluidos de la columna.

En los últimos años se ha observado una gran tendencia hacia el empleo de sistemas que contribuyan adicionalmente a la elucidación estructural de los analitos. Con este fin se están empleando espectrómetros de masas en tándem (MS^n), que es en la actualidad la herramienta analítica más potente en el campo del análisis de residuos de plaguicidas en diversas matrices. El uso de este tipo de detección presenta una mejora en la sensibilidad y selectividad del método analítico para el análisis de trazas, permitiendo una confirmación inequívoca de los plaguicidas detectados mediante la comparación de los espectros de MS^n del estándar y de la muestra (Lehotay, 2000; Gamón y col., 2001).

Las tendencias actuales en el análisis de residuos de plaguicidas por GC tienen como objetivo fundamental la obtención de mejoras con respecto a la GC convencional, entre las que destacan: aumento en la capacidad de separación de los analitos, eliminación de las interferencias de la matriz de la muestra, aumento del número de plaguicidas separados, disminución del tiempo de análisis e incremento en el rendimiento analítico que permita realizar un mayor número de análisis. Para lograr estos objetivos, en los últimos años se ha desarrollado lo que se conoce como “GC rápida” (*faster GC*, Dömötöróvá y Matisová, 2008), que se puede clasificar, atendiendo al tiempo de análisis, en *fast GC*, en el rango de minutos, *very fast GC*, en segundos y *ultra fast GC*, en sub-segundos (van Deursen y col., 2000).

Existen tres vías principales de actuación para aumentar la velocidad de la separación (Korytár y col., 2002; Matisová y Dömötöróvá, 2003):

- Minimizar la resolución, a partir de una reducción en la longitud de la columna, incremento en la velocidad del gas portador, uso de temperaturas iniciales y finales más altas, empleo de columnas con recubrimiento de bajo grosor, etc.
- Maximizar la selectividad del sistema cromatográfico, haciendo uso de fases estacionarias más selectivas (como los líquidos iónicos), columnas acopladas, sistemas de detección altamente selectivos (MS), o bien aplicando la GC multidimensional (fundamentalmente la GC bidimensional, GCxGC).
- Implantar un método que permita disminuir el tiempo de análisis a resolución constante, reduciendo el diámetro interno de la columna (*narrow-bore columns*), utilizando hidrógeno como gas portador, disminuyendo la presión, etc.

La mayoría de estrategias para aumentar la velocidad de la GC se basan en una reducción en el diámetro interno de la columna (Donato y col., 2007). Este modo de actuación se suele acompañar de un cambio en la geometría de la columna (disminución de la longitud la columna y del grosor de la fase estacionaria) o de sus parámetros operativos (incremento en la velocidades del flujo de gas portador y de calentamiento y, en algunos casos, uso del hidrógeno como gas portador). Sin embargo, su baja capacidad combinada con la inyección reiterada de extractos puede originar una menor resolución respecto de las columnas convencionales. Esto junto con las limitaciones de tipo práctico restringe el uso de este tipo de columnas. La Tabla I.2.1 muestra ejemplos recientes sobre el empleo de columnas de diámetro interno reducido ($\leq 0,2$ mm) utilizadas para la determinación de plaguicidas en diversas matrices mediante GC de alta velocidad.

Otras estrategias utilizadas en muchos casos para conseguir separaciones relativamente rápidas de los plaguicidas mediante GC se basan en la aplicación de la GC de baja presión y en el acoplamiento de varios cromatógrafos de gases. En el primer caso, las bajas presiones empleadas originan un aumento de la difusividad de los plaguicidas en la fase gaseosa, provocando un incremento en la velocidad óptima del gas portador. Como consecuencia, se consiguen separaciones más rápidas comparadas con el uso de la misma columna operando a una presión de salida igual a la atmosférica. De hecho, en separaciones de plaguicidas se han

obtenido incrementos de velocidad de hasta seis veces (Korytár y col., 2002). En general, el uso de la GC de baja presión reduce como mínimo a la mitad el tiempo total requerido utilizando GC capilar convencional. Esto se consigue utilizando columnas relativamente cortas (10 m) y anchas ($\geq 0,32$ mm de diámetro interno), que permiten trabajar a bajas presiones a lo largo de toda la columna (Hird, 2008; Dömötöróvá y Matisová, 2008). Este tipo de estrategia se ha utilizado en varias ocasiones para analizar plaguicidas de distintas familias en zanahoria (Mastovská y col., 2001), pepino y pimiento (Arrebola y col., 2003), tomate (Arrebola y col., 2003; Walorczyk y Gnusowski, 2006), aguacate (Fernández-Moreno y col., 2006), kiwi, chirimoya y mango (Martínez-Vidal y col., 2007), así como en alimentos para bebés que contienen manzana (Cajka y col., 2008).

El reciente desarrollo de la GC multidimensional y en particular de la GCxGC permite, gracias al acoplamiento de dos sistemas cromatográficos y a la utilización en un único análisis de dos fases estacionarias de distinta naturaleza, multiplicar la resolución cromatográfica, la selectividad y la sensibilidad así como aumentar en gran medida el número de plaguicidas separados con respecto a la GC convencional, lo que le confiere una gran utilidad.

Mediante la GCxGC, la muestra se somete a dos separaciones independientes en un único análisis. Inicialmente la muestra se introduce en una primera columna, de tipo convencional y se aplican las condiciones de temperatura programadas. A continuación, el efluente de dicha columna entra en un modulador, que lo atrapa, lo focaliza y lo libera en una segunda columna, más corta, donde se completa la separación. El operador controla qué fracción de efluente entra en la segunda columna. Junto con las ventajas mencionadas, esta técnica permite obtener una mayor información acerca de la identificación de los componentes.

Tabla 1.2.1. Aplicaciones recientes de la estrategia de reducción del diámetro interno de la columna para la determinación de residuos de plaguicidas mediante GC de alta velocidad.

Plaguicida y matriz	Preparación de la muestra	Tipo y tamaño de la columna	Detección y modo de operación	LOD (LOQ)	Referencia
17 plaguicidas de distintas familias en aguas de consumo humano y de río	LLE	HP-1; 10 m x 0,10 mm D.I. x 0,10 µm	Q-MS, EI-SIM	1-100 ng/L	Hada y col., 2000
13 plaguicidas de distintas familias en especias	-	DB5-MS, 6 m x 0,20 mm D.I. x 0,33 µm	SMB-Q-MS	0,07 mg/kg	Kochman y col., 2002
6 plaguicidas de distintas familias en lechuga	Extracción sólido-líquido	J&W DB5-MS, 20 m x 0,18 mm D.I. x 0,18 µm	TOF-MS	5,0 µg/kg	Patel y col., 2003
15 organoclorados en aguas subterráneas y de consumo humano	SPE	HP-1MS, 15 m x 0,10 mm D.I. x 0,40 µm	Q-MS, EI-SIM	2,5-3,0 ng/L	Korenková y col., 2003
20 plaguicidas de distintas familias en melocotón	Extracción sólido-líquido → HPGPC	DB-5 MS, 20 m x 0,18 mm D.I. x 0,18 µm	HRTOF-MS	(0,50-25 µg/kg)	Cajka y Hajslová, 2004
10 plaguicidas de distintas familias en mezcla de estándares	-	HP-1MS, 5 m x 0,10 mm D.I. x 0,40 µm	FID, ECD	1,5 ng/mL	Dömötöróvá y col., 2005a

19 plaguicidas de distintas familias en manzana	Extracción sólido-líquido → SPE	CP-Sil 8 CB, 15 m x 0,15 mm D.I. x 0,15 µm	Q-MS, EI-SIM	(0,37-1,6 µg/kg)	Hercegová y col., 2005; Kirchner y col., 2005; Dömötöróvá y col., 2006; Hercegová y col., 2006
17 plaguicidas de distintas familias en manzana	MSPD	CP-Sil 8 CB, 25 m x 0,15 mm D.I. x 0,40 µm	ECD, Q-MS, EI-SIM	(0,06-5 µg/kg)	Dömötöróvá y col., 2005b
19 plaguicidas de distintas familias en manzana y alimentos para bebés que contienen manzana	QuEChERS	CP-Sil 8 CB, 15 m x 0,15 mm D.I. x 0,15 µm	Q-MS, EI-SIM	(0,08-3,4 mg/kg)	Kirchner y col., 2005; Hercegová y col., 2006; Hercegová y col., 2007
61 plaguicidas de distintas familias en manzana	QuEChERS	CP-Sil 8 CB, 15 m x 0,15 mm D.I. x 0,15 µm	Q-MS, EI-SIM	(<5,0 µg/kg)	Kirchner y col., 2008; Húsková y col., 2008

LOD: Límite de detección; LOQ: Límite de cuantificación; LLE: Extracción líquido-líquido; D.I.: Diámetro interno; Q: Cuadrapolo; EI: Ionización por impacto electrónico; SMB: Haz molecular supersónico; TOF: Tiempo de vuelo; SPE: Extracción en fase sólida; HPGPC: Cromatografía de permeación en gel de alta presión; HRTOF: Alta resolución-tiempo de vuelo; FID: Detector de ionización de llama; MSPD: Dispersión de la matriz en fase sólida; QuEChERS: Método de preparación de muestras "quick, easy, cheap, effective, rugged and safe".

Además, mediante la GCxGC es posible enriquecer compuestos presentes en cantidades de trazas; en este sentido, esta técnica puede ser aplicada como una técnica de muestreo selectivo, en la que la primera columna se utiliza como un sistema de separación, seguido de una transferencia selectiva de la fracción de interés a la segunda columna.

En lo que respecta al análisis de residuos de plaguicidas, la GCxGC se ha aplicado recientemente en varias ocasiones (Dömötöróvá y Matisová, 2008, ver Tabla I.2.2). Como puede observarse, el acoplamiento GCxGC-MS es el más común. Sin embargo, la dificultad práctica y los costes de análisis asociados al empleo de esta técnica limitan actualmente su aplicación en análisis de rutina.

1.2.2 Cromatografía líquida de alta eficacia

En la década de los 80 se comenzó a potenciar el uso de la LC y, desde entonces, su aplicación en el campo del análisis de residuos de plaguicidas se ha extendido considerablemente (Hogendoorn y van Zoonen, 2000). La diversidad de detectores, ultravioleta (UV), diodos integrados (DAD), fluorescencia (FD), electroquímico, MS, etc., así como la variedad de columnas disponibles y la posibilidad de llevar a cabo gradientes de elución más o menos complejos han incrementado la cantidad de estudios relacionados con el análisis de plaguicidas mediante esta técnica (Tadeo y col., 2004; Andreu y Picó, 2004; Gámiz-Gracia y col., 2005).

A pesar de que inicialmente la LC se aplicó a plaguicidas cuyo análisis por GC no era viable, los desarrollos recientes que se han realizado en los sistemas de detección y en la tecnología de las columnas demuestran por qué se ha extendido el uso de la LC en este campo de trabajo (Hogendoorn y van Zoonen, 2000). Además, al igual que en GC, el acoplamiento de la LC con la MS (LC-MSⁿ, y en particular HPLC-MSⁿ) proporciona un aumento de sensibilidad y de selectividad con respecto a los detectores universales, contribuyendo adicionalmente a la elucidación estructural, que resulta de gran utilidad en la identificación y confirmación de los plaguicidas analizados.

Tabla I.2.2 Aplicaciones recientes de la GCxGC al análisis de residuos de plaguicidas.

Plaguicida y matriz	Preparación de la muestra	Tipo y tamaño de la columna	Detección y modo de operación	LOD (LOQ)	Referencia
58 plaguicidas de distintas familias en nabo y zanahoria	Extracción sólido-líquido	1D: CP-Sil 5 CB, 15 m x 0,25 mm D.i. x 0,25 µm; 2D: BPX50, 0,80 m x 0,1 mm D.i. x 0,10 µm	TOF-MS	3-23 µg/L	Dallüge y col., 2002
11 plaguicidas halogenados en muestras humanas	SBSE	1D: DB-1, 15 m x 0,25 mm D.i. x 0,25 µm; 2D: HT-8, 2,0 m x 0,10 mm D.i. x 0,10 µm	TOF-MS	Del orden de ng/L	Focant y col., 2003
20 plaguicidas de distintas familias en manzana y melocotón	Extracción sólido-líquido → HPGPC	1D: DB-XLB, 30 m x 0,25 mm D.i. x 0,25 µm; 2D: DB-17, 1,0 m x 0,10 mm D.i. x 0,10 µm	TOF-MS	0,200-100 µg/kg	Zrostlíková y col., 2003
9 fungicidas en col de Bruselas	Extracción sólido-líquido	1D: BPX5, 30 m x 0,25 mm D.i. x 0,25 µm; 2D: BPX50, 1,0 m x 0,15 mm D.i. x 0,15 µm	NPD, µECD	29-74 ng/L (96-246 ng/L)	Khummueng y col., 2006
Diazinón y tionazín en cítricos y ciruela pasa	-	1D: DB-5 ms, 15 m x 0,25 mm D.i. x 0,25 µm; 2D: DB 50, 2,0 m x 0,32 mm D.i. x 1,0 µm	SMB-Q-MS	-	Kochman y col., 2006

SBSE: Extracción sobre barra magnética agitadora.

Los avances recientes en el análisis de plaguicidas mediante LC se han centrado fundamentalmente en la obtención de separaciones más rápidas, de menor coste y mayor eficacia, con adecuadas sensibilidades y selectividades, así como en el uso de fases móviles menos tóxicas para el medio ambiente y para el operador. En este sentido, se han introducido mejoras en las columnas, en los sistemas de bombeo y en los sistemas de detección (principalmente el acoplamiento LC-MSⁿ).

El desarrollo reciente de la cromatografía líquida de ultra-alta presión (UPLC) ha sido uno de los mayores avances realizados en cromatografía de líquidos, puesto que esta nueva técnica permite obtener un aumento en la velocidad de análisis, en la sensibilidad y en la resolución. Estas ventajas son consecuencia de las modificaciones llevadas a cabo en la tecnología de la columna y en la instrumentación: el uso de columnas relativamente cortas empaquetadas con fases estacionarias de tamaño de partícula inferior a 2,5 μm permiten disminuir el tiempo de análisis cromatográfico. De hecho, según la ecuación de van Deemter, que describe la relación entre la velocidad de flujo y la altura de plato teórico de la columna, una disminución en el tamaño de la partícula lleva consigo un aumento en la velocidad de flujo sin pérdida de resolución cromatográfica. Como consecuencia, se hace necesaria la aplicación de presiones superiores a las empleadas en LC convencional (hasta 15.000 psi, Swartz y Murphy, 2004), lo que lleva implícito una modificación en la instrumentación, principalmente en los sistemas de bombeo.

Las resoluciones y eficacias elevadas que se obtienen en las separaciones por UPLC hacen necesario el uso de sistemas de detección con velocidades de adquisición de datos elevadas (por encima de 10 puntos/pico, Hird, 2008) y volúmenes pequeños de detección. Por esta razón, los acoplamientos UPLC-MS y UPLC-MS/MS con los analizadores Q o TOF son los más habituales.

Por todo ello, las separaciones por UPLC ofrecen beneficios considerables respecto de las obtenidas mediante LC convencional y su aplicación a la determinación de residuos de plaguicidas es cada vez mayor (Mezcua y col., 2006;

Leandro y col., 2007). Sin embargo, al ser una técnica muy reciente y costosa, en la actualidad no se utiliza de manera habitual en los laboratorios analíticos. La Tabla I.2.3 resume la aplicación de esta técnica al análisis de plaguicidas en diversas matrices.

Otras alternativas que se han introducido en LC se basan en una modificación de la tecnología de la columna, haciendo uso de polímeros de impronta molecular (MIP), en el uso de fases móviles menos contaminantes, como los líquidos iónicos, y en la aplicación de la nanocromatografía de líquidos y de la LC multidimensional (fundamentalmente la bidimensional, LCxLC).

El desarrollo relativamente reciente de columnas de LC que contienen MIP ha llegado a ser bastante popular en el análisis de plaguicidas, dada su gran estabilidad, bajo coste y sencillez de preparación (Hogendoorn y van Zoonen, 2000; Ahmed, 2001). Estos polímeros sintéticos poseen propiedades de reconocimiento molecular selectivo, debido a que los sitios de reconocimiento dentro de la matriz del polímetro son complementarios a los analitos en la forma y posición de los grupos funcionales. Como consecuencia, el uso de MIP en las columnas de HPLC permite incrementar la selectividad de la separación.

En lo que respecta al uso de MIP en HPLC para la determinación de plaguicidas, la mayor parte de trabajos se han centrado en la separación de compuestos quirales a partir de fases estacionarias quirales altamente selectivas (Hogendoorn y van Zoonen, 2000). Recientemente, los MIP se han utilizado en la separación de plaguicidas mediante HPLC en papas, maíz y guisantes (Tamayo y Martín-Esteban, 2005), en frutas, como naranja, limón, uva, fresa y zumo de naranja (Turiel y col., 2005), así como en manzana y plasma de rata (Hantash y col., 2006).

Tabla I.2.3 Aplicaciones recientes de la técnica UPLC al análisis de residuos de plaguicidas.

Plaguicida y matriz	Preparación de la muestra	Columna: Dimensiones y tamaño de partícula	Fase Móvil	Detección y modo de operación	LOD (LOQ)	Referencia
17 plaguicidas de distintas familias en manzana	Extracción sólido-líquido	C ₁₈ : 2,1 mm x 100 mm; 1,7 µm	Gradiente. Fase móvil A: agua; fase móvil B: metanol	Q-MS/MS	- (0,5-8 µg/kg)	Koesukwi-wat y col., 2006
9 plaguicidas de distintas familias en agua de consumo humano	SPE	C ₁₈ : 2,1 mm x 100 mm; 1,7 µm	Gradiente. Fase móvil A: 0,1% ácido fórmico en agua; fase móvil B: ACN	QqQ-MS/MS	0,10-20 ng/L (-)	Mezcuca y col., 2006
Imazalil en pera	Extracción sólido-líquido	C ₁₈ : 2,1 mm x 50 mm; 1,7 µm	Gradiente. Fase móvil A: formiato de amonio 10 mM en agua; fase móvil B: metanol	Q-TOF-MS/MS	0,4 µg/kg (2 µg/kg)	Picó y col., 2007
52 plaguicidas de distintas familias en naranja, papa y alimentos para bebés con cereales	SPE	C ₁₈ : 2,1 mm x 50 mm; 1,7 µm	Gradiente. Fase móvil A: agua con ácido acético 17,5 mM; fase móvil B: metanol con ácido acético 17,5 mM	Q-MS/MS	-	Leandro y col., 2007
32 plaguicidas de distintas familias en limón y pasas	SPE	C ₁₈ : 2,1 mm x 100 mm; 1,7 µm	Gradiente. Fase móvil A: 0,01% ácido fórmico en agua; fase móvil B: 0,01% ácido fórmico en metanol	QqQ-MS/MS	- (0,01 mg/kg)	Pozo y col., 2007
31 plaguicidas de distintas familias en agua de río	SPE	C ₁₈ : 2,1 mm x 100 mm; 1,7 µm	Gradiente. Fase móvil A: 9:1 (v/v) agua ultrapura:ACN con 0,1% ácido fórmico; fase móvil B: 0,1% ácido fórmico en ACN	QqQ-MS/MS	1-20 ng/L (10-50 ng/L)	Gervais y col., 2008

6 fungicidas oxazoles en vino, mosto y zumo de frutas	SBSE y MASE C ₁₈ : 4,6 mm x 50 mm; 1,8 µm	Isocrático. 50:50 (v/v) agua:ACN	DAD	0,05-12 ng/mL (0,15-40 ng/mL)	Viñas y col., 2008
53 plaguicidas de distintas familias en pepino, fresa, aceituna y naranja	QuEChERS C ₁₈ : 2,1 mm x 100 mm; 1,7 µm	Gradiente. Fase móvil A: 0,01% ácido fórmico en agua; fase móvil B: 0,01% ácido fórmico en metanol	QqQ-MS/MS	<3 µg/kg (<10 µg/kg)	Garrido-Frenich y col., 2008
100 plaguicidas de distintas familias sólido-líquido en fresa	Extracción C ₁₈ : 2,1 mm x 50 mm; 1,7 µm	Gradiente. Fase móvil A: 95:5 (v/v) agua:metanol con acetato amónico 5 mM; fase móvil B: metanol con acetato amónico 5 mM	TOF-MS/MS	-	Taylor y col., 2008
90 plaguicidas de distintas familias en zumo de frutas	QuEChERS C ₁₈ : 2,1 mm x 100 mm; 1,7 µm	Gradiente: Fase móvil A: 0,01% ácido fórmico en agua; fase móvil B: metanol	QqQ-MS/MS	0,7- 3,1 µg/L (1,7- 5,0 µg/L)	Romero-González y col., 2008
13 plaguicidas fenoxiacidos en arroz	QuEChERS C ₁₈ : 2,1 mm x 100 mm; 1,7 µm	Gradiente. Fase móvil A: 0,1% ácido fórmico en agua; fase móvil B: 0,1% ácido fórmico en metanol	Q-MS/MS	0,5-5 µg/kg (-)	Koesukwiwat y col., 2008

ACN: Acetonitrilo; QqQ: Triple cuadrupolo; MASE: Extracción con disolventes asistida por membranas.

Otra estrategia aplicada recientemente al análisis de residuos de plaguicidas por HPLC es la sustitución de las fases móviles convencionales, que son tóxicas y relativamente costosas, por otras que minimicen estos factores. En este sentido, se ha investigado el uso de líquidos iónicos como aditivos para las fases móviles empleadas en HPLC. Los líquidos iónicos son sales con punto de fusión próximo a la temperatura ambiente. Puesto que están constituidos únicamente por iones pueden comportarse como disolventes, tanto para moléculas polares como apolares (Berthod y Carda-Broch, 2003). Utilizados como aditivos en HPLC, los líquidos iónicos permiten incrementar la fuerza eluotrópica de la fase móvil, reduciendo considerablemente los tiempos de análisis. Sin embargo, en lo que respecta al análisis de plaguicidas, estas nuevas fases móviles únicamente permiten separar plaguicidas básicos, de ahí que su utilización en este campo sea limitada.

El desarrollo de la nanocromatografía de líquidos y de la LCxLC ha supuesto un avance importante en LC convencional. En nanocromatografía de líquidos se utilizan columnas de diámetro interno inferior al de las columnas convencionales (entre 10 y 150 μm) obteniendo, como consecuencia, un aumento de sensibilidad (Hernández-Borges y col., 2007). Además, en esta técnica los flujos de fase móvil son del orden de nL/min, facilitando el acoplamiento a detectores de MS. Por tanto, la nanocromatografía de líquidos es ideal para el análisis de pequeñas cantidades de muestra.

En la actualidad, las columnas monolíticas han sido una buena alternativa a las columnas de partículas empaquetadas convencionales para separaciones de alta eficacia en HPLC (Tanaka y col., 2002; Ishizuka y col., 2002; Zou y col., 2002; Cabrera, 2004), siendo de especial relevancia su aplicación en nanocromatografía de líquidos. La columna monolítica consiste en una pieza de un material poroso continuo y herméticamente sellado contra la pared de la misma, de manera que la fase móvil está obligada a pasar a través de todo el lecho de la columna, sin que haya ningún tipo de espacio intersticial libre. Gracias al pequeño tamaño de sus esqueletos de sílice y a sus amplios macroporos se alcanzan mayores eficacias de separación que con columnas de partículas empaquetadas a una similar presión de trabajo (Buszewski y col., 2002). Además de la obtención de eficacias de separación

elevadas, el uso de columnas monolíticas proporciona un aumento en la permeabilidad de la columna, una reducción de los tiempos de análisis y una morfología y selectividad modificables. Sin embargo, este tipo de columnas presenta el inconveniente de que al utilizar flujos de fase móvil altos, el consumo de disolventes es mucho mayor. La nanocromatografía líquida se ha aplicado principalmente a la separación de biomoléculas en proteómica y biotecnología y en algunos casos al análisis de plaguicidas (Hernández-Borges y col., 2007). En la Tabla 1.2.4 pueden observarse aplicaciones de la nanocromatografía de líquidos al análisis de plaguicidas en los últimos años.

Al igual que la GCxGC, la LCxLC ha supuesto un avance importante en cromatografía, ya que permite realizar un análisis eficaz de muestras complejas, ofreciendo un poder de separación mucho mayor que en LC convencional. En LCxLC la muestra se somete por completo a dos separaciones diferentes, originando un mapa topográfico representativo de toda la muestra. Por tanto, la aplicación de la LCxLC al análisis de plaguicidas se presenta como una innovación prometedora en este campo.

1.2.3 Electroforesis capilar

A pesar de que las técnicas cromatográficas (GC y HPLC) son las más utilizadas en el análisis de plaguicidas, en la actualidad la CE ha demostrado ser una técnica alternativa muy útil en este campo, como muestra el creciente número de trabajos publicados en la última década. Ello es debido a las numerosas ventajas que presenta esta técnica, entre las cuales cabe destacar la obtención de tiempos de análisis cortos, altas eficacias, facilidad de automatización, bajo coste, versatilidad y bajos requerimientos de muestra y de reactivos. Sin embargo, la utilización de la CE como técnica de análisis de rutina para resolver problemas analíticos es menor de lo que se podía prever a partir del gran número de artículos de investigación publicados o de las expectativas de los fabricantes de equipos.

Tabla 1.2.4 Aplicaciones recientes de la nanocromatografía líquida al análisis de plaguicidas.

Plaguicida y matriz	Preparación de la muestra	Columna: Dimensiones y tamaño de partícula	Fase Móvil	Detección y modo de operación	LOD (LOQ)	Referencia
Carbarilo, carben-dazima, clorpropam y propanil en mezcla de estándares	-	PepMap C ₁₈ 75 µm D.I. x 15 cm, 3 µm; PepMap C ₁₈ 50 µm D.I. x 15 cm, 3 µm	Gradiente. Fase móvil A: acetato amónico 5 mM y 0,1% ácido fórmico en agua; fase móvil B: acetato amónico 5 mM y 0,1% ácido fórmico en ACN	IT-MS	-	Moneti y col., 2001
10 plaguicidas organofosforados en agua de río	SPE	C ₁₈ 75 µm D.I. x 15 cm, 3 µm	Isocrático. Agua/ACN 1:1 (v/v)	Q-MS	3 ng/L (-)	Cappiello y col., 2002
7 plaguicidas de tintas familias en mezcla de estándares	-	C ₁₈ 75 µm D.I. x 15 cm, 3 µm	Isocrático. Agua/ACN 1:1 (v/v)	Q-MS	0,20-75 mg/L (-)	Cappiello y col., 2003
Mecoprop, dicloroprop y fenoprop en mezcla de estándares	-	Partículas de sílice modificadas. 100 µm x 21 cm, 5 µm	Isocrático. 85:10:5 (v/v/v) metanol/agua/acetato amónico 500 mM a pH 4,5	UV	1,4-4,2 mg/L (4,5-13,8 mg/L)	Rosales-Contrado y col., 2004
8 plaguicidas de tintas familias en agua marina	SPE	C ₁₈ 75 µm D.I. x 15 cm, 3 µm	Isocrático. Agua/ACN 1:1 (v/v)	Q-MS	0,400-117,7 ng/L (-)	Famiglini y col., 2005
Mecoprop, dicloroprop, diclofop y fenoxaprop en mezcla de estándares	-	CHI-TBB 100 µm D.I. x 375 µm, 5 µm	Isocrático. 89:10:1 (v/v/v) <i>n</i> -hexano/2-propanol/ácido acético	UV	-	Fanali y col., 2006

IT: Trampa de iones.

La versatilidad que caracteriza a la CE se debe, en gran medida, a sus numerosos modos de operación, cada uno de ellos con unas características y mecanismos de separación particulares, que permiten afrontar una gran variedad de análisis. De todos los modos de operación existentes en CE, electroforesis capilar en zona (CZE), cromatografía electrocinética micelar (MEKC), electrocromatografía capilar (CEC), electroforesis capilar en medios no acuosos (NACE), electroforesis capilar en gel (CGE), isoelectroenfoque capilar (CIEF), isotacoforesis (CITP), etc., en lo que respecta a la separación de plaguicidas, los más utilizados en este campo han sido CZE, MEKC, CEC y NACE. Las características más importantes de los mismos y sus mecanismos de separación se muestran en la Tabla I.2.5, así como algunos ejemplos de trabajos recientemente publicados.

Una de las mayores limitaciones de la CE es su baja sensibilidad, que se asocia tanto al pequeño volumen de muestra inyectado (1-10 nL) como, en el caso de la detección espectroscópica, al pequeño paso óptico que corresponde el diámetro interno del capilar (normalmente 50 o 75 μm , Núñez y Sentellas, 2002). Por tanto, para hacer de la CE una técnica competitiva en términos de sensibilidad, es necesario solventar uno o ambos problemas. Diversos autores han estudiado posibles modificaciones del sistema electroforético. Tal es el caso de la optimización del sistema de detección, que inicialmente se llevó a cabo utilizando celdas en forma de Z o celdas “burbuja”, que permitieron aumentar el paso óptico y originaron, en contraposición, una pérdida de resolución (Turnes y col., 1996). Más adelante, el empleo de detectores altamente sensibles como la fluorescencia inducida por láser (LIF, Horstkotter y col., 2002) y sobre todo la MS (Cherkaoui y Veuthey, 2002), permitió también incrementar considerablemente la sensibilidad de la CE.

Tabla 1.2.5 Características y mecanismos de separación de los modos de operación aplicados en la determinación de plaguicidas por CE y algunos ejemplos de trabajos recientemente publicados.

Modo de operación	Características	Mecanismo	Plaguicida	Referencia
CEZ	Capilar lleno de electrolito de separación (BGE), aplicación de un campo eléctrico. Aplicación: plaguicidas, aminoácidos, péptidos, proteínas, iones inorgánicos, compuestos quirales, etc.	Movilidad electrofórica de los analitos en disolución	Metolacloro, ácido etanosulfónico y ácido oxanílico	Klein y col., 2006
MEKC	Capilar lleno de BGE conteniendo un tensoactivo. Aplicación: plaguicidas, vitaminas, aminoácidos, fármacos, hidrocarburos aromáticos, etc.	Interacciones hidrofóbicas/iónicas de los analitos con las micelas	Acrinatrin, bitertanol, ciproconazol, fludioxonil, flutriafol, miconobutanil, piriproxfén y tebuconazol	Juan-García y col., 2005b
CEC	Capilar relleno de fase estacionaria. Aplicación: plaguicidas, esteroides, diuréticos, contaminantes, etc.	Interacciones diferenciales de un soluto en dos fases	Metribuzina, metribuzina desaminada y diketometribuzina	Huertas-Pérez y col., 2006
NACE	BGE orgánico, corrientes bajas, voltajes elevados. Aplicación: plaguicidas, medicamentos, alcaloides, antioxidantes, péptidos, etc.	Propiedades físicas-químicas de los disolventes	Tetrametrín, fenpropatrín, cipermetrín, deltametrín, fenvalerato y permetrín N-metilcarbamatos	Ye y col., 2006 Wu y col., 2007
			Simazina, atrazina, propazina, ametrín, prometrín y terbutrín Piraclofos, profenofos, profiofos y sulprofos	Carabias-Martínez y col., 2007 Huang y col., 2007

Después de la detección por absorción UV-Visible (VIS), LIF y MS son los tipos de detección más empleados, puesto que proporcionan una mayor sensibilidad y selectividad. Sin embargo, en lo que respecta al detector LIF, su empleo está limitado a plaguicidas que contengan grupos fluoróforos o que posean grupos susceptibles de derivatización. En la actualidad, la MS ha alcanzado una gran importancia como método de detección de plaguicidas en CE (Ross, 2001). De hecho, el acoplamiento de un detector tan selectivo como la MS a una técnica analítica tan versátil y que proporciona eficacias tan elevadas como la CE da como resultado una potente herramienta de análisis. Además, el acoplamiento CE-MS proporciona una elevada sensibilidad así como información y confirmación estructural de los plaguicidas analizados a partir de su masa molecular y/o patrones de fragmentación obtenidos (acoplamiento CE-MS/MS).

En los últimos años se han publicado diversos trabajos referentes a la aplicación de la CE-MSⁿ al análisis medioambiental y, en particular, a la determinación de plaguicidas. La Tabla 1.2.6 muestra los estudios más recientes llevados a cabo en este campo. Como puede observarse, el modo de CE más habitual para el acoplamiento en línea con un espectrómetro de masas es CZE, ya que permite utilizar un electrolito de separación más compatible con la posterior detección por MS. De todas las interfases CE-MS descritas hasta el momento, la interfase de ionización por electrospray (ESI) es la más utilizada. A pesar de existir tres modalidades (coaxial con flujo adicional, sin flujo adicional y de unión líquida), la primera de ellas es la más utilizada en CE y, también, en el análisis de plaguicidas (Carneiro y col., 2000; Rodríguez y col., 2002; Picó y col., 2003).

Otros procedimientos que permiten incrementar la sensibilidad de la CE se basan en la introducción de una etapa de enriquecimiento de la muestra previa a la separación electroforética, originando un aumento de la cantidad de analito introducida en el capilar y por tanto, un incremento de sensibilidad. Estos procedimientos, denominados métodos de preconcentración, pueden realizarse de dos maneras diferentes:

Tabla 1.2.6 Aplicaciones recientes del acoplamiento CE-MSⁿ al análisis de plaguicidas en diversas matrices.

Plaguicida y matriz	Preparación de la muestra	Modo CE y BGE	Interfase CE-MS	Analizador	LOD (LOQ)	Referencia
Imazamox en agua de estanque, de pozo y potable	SPE fuera de línea	CZE; formiato amónico 10 mM a pH 6,7-7,0	ESI (líquido adicional: metanol/formiato amónico 5,0 mM a pH 3,7. Flujo: 4,0 µL/min)	Q	20 ng/L (200 ng/L)	Safarpour y col., 2004
Pirimetanil, pirifenox, ciprodinil, cromazina y pirimicarb en zumo de uva y de naranja	SPME	CZE; acetato amónico 0,3 M a pH 4	ESI (líquido adicional: isopropanol/agua. Flujo: 3,7 µL/min)	IT	0,09-0,30 µg/mL (-)	Herrández-Borges y col., 2004b
Metosulam, metil-cloransulam, diclosulam, florasulam y flumetsulam en bebida de soja	SPE fuera de línea y <i>stacking</i>	CZE; ácido fórmico 24 mM y carbonato amónico 16 mM a pH 6,4	ESI (líquido adicional: 82,5; 17,5 (V/V) metanol/agua con un 2% trietilamina. Flujo: 5,8 µL/min)	IT	74-150 µg/L (247-500 µg/L)	Herrández-Borges y col., 2005d
Dinoseb, pirimicarb, procimidona, pirifenox, pirimetanil y tiabendazol en melocotón y neectarina	SPE fuera de línea	CZE; acetato amónico 0,3 M a pH 4 con 10% (V/V) metanol	ESI (líquido adicional: 100% metanol en 0,8% ácido fórmico. Flujo: 3,0 µL/min)	IT	-(1-200 µg/kg)	Juan-García y col., 2005a
Glifosato, glufosinato y ácido aminometilfosfónico en agua de río	-	CZE; acetato amónico 40 mM a pH 9,0	Plasma acoplado por inducción (ICP)	Detección elemental específica ³¹ P	0,40-0,94 mg/L (-)	Wuilloud y col., 2005
10 <i>N</i> -metilcarbamatos en agua de consumo humano	SPE fuera de línea	MEKC; perfluorooctanoato amónico 50 mM/isopropanol 98: 2 (V/V) a pH 9,0	ESI (líquido adicional: acetato amónico 5,0 mM en 50:50 (V/V) agua/metanol. Flujo: 4,0 µL/min)	IT	0,01-0,08 mg/L (-)	Van Biesen y Bottaro, 2006

- Fuera de línea, es decir, preconcentración por medio de las técnicas habituales (SPE, SPME, etc.) y posterior inyección de los extractos concentrados.
- En línea, realizando la etapa de preconcentración en el propio capilar una vez que la muestra ha sido inyectada. Estas técnicas pueden clasificarse, en función del mecanismo de preconcentración, en cromatográficas (SPE en línea) o electroforéticas (técnicas de *stacking*). La Figura I.2.1 presenta un ejemplo del aumento de sensibilidad obtenido mediante la aplicación de algunas de las técnicas de *stacking* en la separación de un grupo de cinco plaguicidas por CE-UV.

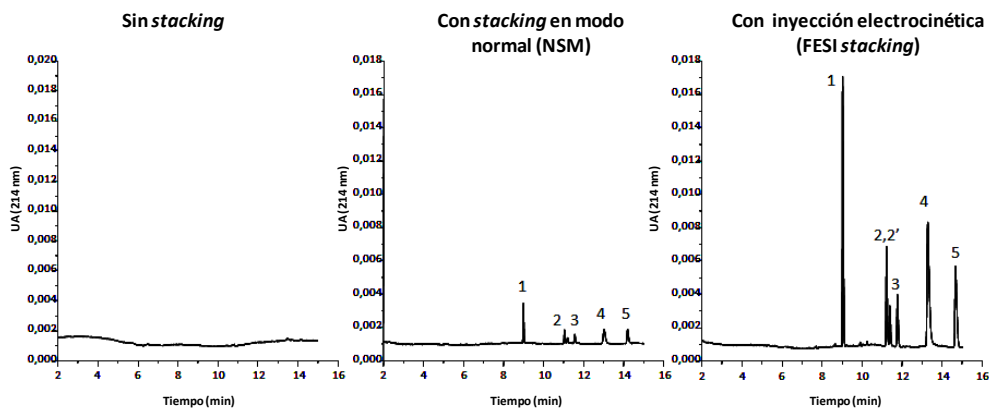


Figura I.2.1 Ejemplo del incremento de sensibilidad obtenido en CE mediante el empleo de técnicas de *stacking* en el análisis de plaguicidas. Identificación: Círomazina (1), isómeros Z y E del pirifenox (2, 2'), pirimicarb (3), ciprodinil (4) y pirimetanil (5). (Adaptado de Hernández-Borges y col., 2005a).

Las tendencias actuales en el análisis de plaguicidas por CE tienen como objetivo fundamental llevar a cabo un mayor desarrollo de la técnica y una implementación de su utilización en los laboratorios de rutina. En este sentido, se pretende aumentar sus aplicaciones a muestras de diversa naturaleza, tanto en el ámbito medioambiental como en el alimentario e investigar nuevas estrategias que proporcionen un incremento de sensibilidad, selectividad, resolución y eficacia, así como una disminución del tiempo de análisis, especialmente, haciendo uso de CE-MS.

Uno de los avances que se han llevado a cabo recientemente en CE ha sido el establecimiento de la electroforesis en microchip, que permite disminuir los

tiempos de análisis, logrando separaciones “ultra-rápidas” del orden de segundos e incluso microsegundos en algunas aplicaciones. Otras ventajas asociadas a esta metodología son: eficacias elevadas, capacidad multicanal para aumentar el rendimiento del procesado muestras, posibilidad de integrar las diferentes etapas de preparación de la muestra en el propio dispositivo, bajo consumo de reactivos y de muestra, versatilidad y miniaturización del dispositivo (Roper y col., 2008). El actual desarrollo de las tecnologías de microfabricación y modificación de este tipo de sistemas (recubrimientos poliméricos, funcionalización de los sustratos, etc.) convierten a la electroforesis en microchip en una técnica en constante desarrollo y en una poderosa herramienta de separación y cuantificación de analitos. Entre las distintas separaciones basadas en esta metodología, la electrocromatografía en microchip y la cromatografía electrocinética micelar en microchip son las áreas de mayor crecimiento. Sin embargo, a pesar de las numerosas ventajas de la técnica se presentan dos inconvenientes inherentes a sus características: resolución y sensibilidad limitadas. Estas desventajas se han mejorado gracias al empleo de sistemas de detección efectivos, siendo los más habituales los de fluorescencia, los electroquímicos y de manera más reciente los de MS (Roper y col., 2008).

La electroforesis en microchip se ha utilizado en la separación de una gran variedad de analitos, principalmente macromoléculas tipo proteínas y ácidos nucleicos y pequeñas moléculas, como aminoácidos, péptidos y productos farmacéuticos (Shadpour y col., 2006). Sin embargo, hasta el momento sólo se ha publicado un trabajo, realizado por Smirnova y col. (2008), relacionado con el análisis de plaguicidas. En este estudio, se analizaron cuatro carbamatos (carbaril, carbofurano, propoxur y bendiocarb) en aguas mediante cromatografía electrocinética micelar en microchip. Los cuatro analitos se separaron en un tiempo de análisis de 50 s, con límites de detección (LODs) entre 0,5 y 2 $\mu\text{mol/L}$.

Otros avances en CE se basan en el desarrollo de nuevas estrategias que permitan incrementar la sensibilidad, la resolución y la selectividad de las separaciones. Con ese fin se han utilizado recientemente los líquidos iónicos, que pueden actuar como modificadores del flujo electroosmótico (EOF) al ser introducidos en el BGE (originando recubrimientos dinámicos), o bien pueden

unirse químicamente a la superficie del capilar, originando en este caso recubrimientos covalentes (Shamsi y Danielson, 2007; Buszewski y Studzinska, 2008). La introducción de un líquido iónico en el sistema electroforético influye de manera directa en el mecanismo de separación de los analitos, como consecuencia de su asociación con el mismo.

Los líquidos iónicos se han utilizado en la separación por CE de diferentes tipos de compuestos, entre ellos los plaguicidas, aunque únicamente en una ocasión, concretamente en el análisis de herbicidas clorofenoxiácidos (Yu y col., 2005). Los resultados obtenidos demuestran que los líquidos iónicos permiten obtener tiempos de análisis cortos y muestran habilidad para separar isómeros de posición.

1.3 Preparación de la muestra para el análisis de plaguicidas

En general, debido a la compleja naturaleza de las matrices en las que los plaguicidas se encuentran presentes y a los bajos LMRs exigidos por los organismos reguladores, la preparación eficiente de la muestra, así como la identificación y detección a niveles de trazas, son aspectos muy importantes en un método analítico para la determinación de residuos de plaguicidas. Por tanto, los métodos de análisis aplicados deben incluir un tratamiento previo que permita:

- Extraer el plaguicida selectiva y cuantitativamente de la propia matriz de la muestra, eliminando el mayor número posible de interferencias evitando así errores en la medida analítica.
- Preconcentrar los analitos, especialmente en los casos en que se encuentren a concentraciones muy bajas, procurando obtener factores de preconcentración elevados.
- Favorecer la determinación de los plaguicidas. En muchas ocasiones, la preparación de la muestra debe incluir la transformación de los analitos en diferentes formas químicas que puedan hacer más fácil su separación o detección.

Por todo ello, la etapa de preparación de la muestra es de vital importancia en un proceso analítico, ya que va a permitir cuantificar correctamente los analitos a niveles bajos de LODs, hasta tal punto que, en la actualidad, son pocas las muestras que no la requieren. Sin embargo, se trata de una etapa laboriosa y lenta que suele introducir un elevado número de errores como consecuencia de la pérdida del analito durante todo el proceso, de su posible degradación, de la contaminación de la muestra, etc. Además, la elección y optimización de una etapa adecuada de preparación de la muestra no suele ser sencilla, especialmente cuando se trata de matrices muy complejas como fluidos biológicos o muestras medioambientales. De hecho, cualquier tratamiento de la muestra depende de la naturaleza de la misma y de la técnica analítica que se vaya a emplear, siendo necesario un desarrollo concreto en cada caso. Idealmente, la preparación de la muestra debe ser lo más simple posible no sólo porque así se reduce el tiempo requerido sino, también, porque disminuye la probabilidad de introducir errores.

El pretratamiento de la muestra se puede subdividir en tres etapas que en la práctica se pueden llevar a cabo simultáneamente o no: extracción, para aislar los analitos de la matriz, preconcentración, que normalmente se realiza eliminando parte del disolvente por evaporación y limpieza o *clean-up*, que permite eliminar posibles interferencias de la matriz que pudieran impedir la correcta determinación de los analitos (Cámara y col., 2002).

Entre las técnicas más habituales de preparación de muestras y en particular para la extracción de plaguicidas orgánicos destacan la LLE, SPE y SPME. De manera menos habitual se utilizan otras técnicas como: MASE, SBSE, extracción asistida por microondas (MAE), extracción con disolventes a presión (PLE o ASE) y extracción en el punto de nube (CPE). La Tabla I.3.1 muestra algunos estudios recientes del uso de distintas técnicas de pretratamiento en combinación con GC, HPLC y CE para el análisis de plaguicidas en diversas matrices.

Tabla I.3.1 Aplicaciones más recientes de diferentes técnicas de pretratamiento de muestras en combinación con GC, HPLC y CE para el análisis de plaguicidas.

Tratamiento de la muestra	Método analítico	Plaguicida y matriz	Referencia
LLE	GC	30 insecticidas (organofosforados, piretroides, organoclorados y piridinas) y 5 herbicidas (triazinas) en aceite de oliva virgen	Amvrazi y Albanis, 2006
	HPLC	Carbendazima (fungicida benzimidazol) en trigo	Michel y col., 2006
	CE	2 fungicidas (benzimidazoles), 1 insecticida (carbamato) y 2 metabolitos en pepino	Segura-Carretero y col., 2004
SPE	GC	Clorotalonil (fungicida cloronitrilo) y sus metabolitos en suelo y agua de lago	Chaves y col., 2008
	HPLC	Carbofurano, carbaril y metiocarb (insecticidas carbamatos), en agua y pepino	Huertas-Pérez y García-Campaña, 2008
	CE	5 herbicidas (triazolopirimidinas) en bebida de soja	Hernández-Borges y col., 2005b
SPME	GC	Bromociclono (insecticida organoclorado) en pescado	Fidalgo-Used y col., 2008
	HPLC	7 insecticidas (piretroides) en pepino y sandía	Parrilla-Vázquez y col., 2008
	CE	2 insecticidas (carbamato y triazina) y 3 fungicidas (piridina y anilinopirimidinas) en aguas y zumos de manzana y naranja	Hernández-Borges y col., 2005a
MAE	GC	7 insecticidas (organoclorados y piretroides) en té	Ji y col., 2007
	HPLC	Carbendazima y metil-tiofanato (fungicidas benzimidazoles) en col y tomate	Singh y col., 2007
	CE	-	-
PLE o ASE	GC	2 insecticidas (organofosforado y piretroide), 2 herbicidas (sulfonilurea y <i>N</i> -fenilimida) y 3 fungicidas (acilalanina, trioftalimida y triazol) en suelo de viñedo	Schreck y col., 2008
	HPLC	14 herbicidas (triazinas, fenilureas, triazina y dinitroanilina), 2 fungicidas (carbamato y dicarboximida), 6 insecticidas (piretroides, organoclorados y organofosforados) y 2 metabolitos en suelo	Lesueur y col., 2008a
	CE	6 herbicidas (triazinas) en papa, zanahoria, lechuga, calabacín, judía, naranja y trigo	Carabias-Martínez y col., 2007

(Continúa en la página siguiente)

Tabla I.3.1 (Continuación).

Tratamiento de la muestra	Método analítico	Plaguicida y matriz	Referencia
SBSE	GC	24 insecticidas (organoclorados, organofosforados y carbamato) y 11 herbicidas (triazinas, organoclorado, dinitroanilinas y tiocarbamato) en azafrán	Maggi y col., 2008
	HPLC	6 insecticidas (organofosforados) en miel	Blasco y col., 2004
	CE	6 fungicidas (triazoles y fenilpirrol) y 2 insecticidas (piretroides) en lechuga, tomate, uva y fresa	Juan-García y col., 2005b
MASE	GC	4 herbicidas (triazinas), 11 insecticidas (organoclorados, organofosforados y clo-roacetamida) y 2 metabolitos en caña de azúcar	Zuin y col., 2006
	HPLC	Glifosato (herbicida glicina) y su metabolito (ácido aminometilfosfónico) en zumos de naranja, pomelo, manzana y grosella	Khrolenko y Wieczorek, 2005
	CE	Atrazina (herbicida triazina) en zumos de naranja, pomelo, manzana y grosella	Khrolenko y col., 2002
CPE	GC	5 insecticidas (organofosforados) en orina humana	Jia y col., 2008
	HPLC	3 insecticidas (carbamatos y organofosforado), 2 fungicidas (acilalanina y ácido cinámico) y 2 herbicidas (urea y oxiacetamida) en zumo de fresa	Chen y col., 2008b
	CE	6 herbicidas (triazinas) en agua	Carabias-Martínez y col., 2003

La investigación desarrollada actualmente en lo que al pretratamiento de la muestra se refiere, está orientada hacia el uso de nuevos materiales de extracción, la reducción del empleo de disolventes orgánicos y del tiempo invertido en esta etapa, la aplicación de protocolos automatizados y/o su integración en formatos miniaturizados tales como microchips, que permitan un análisis rápido y sensible de los analitos de interés, especialmente en muestras complejas. Este campo de investigación ha proporcionado resultados interesantes y prometedores y sin duda se trata de una de las principales áreas de investigación en Química Analítica. En la siguiente sección se realiza una breve descripción de las técnicas de preparación de la muestra más utilizadas en el análisis de plaguicidas, prestando especial atención a los avances más recientes llevados a cabo en este campo.

1.3.1 Extracción líquido-líquido

La LLE ha sido tradicionalmente la técnica de extracción, preconcentración y limpieza más utilizada hasta el momento en el análisis de plaguicidas en muestras líquidas, a pesar de que esta técnica suele ser tediosa, larga y con requerimientos de grandes cantidades de disolventes orgánicos. La LLE se basa en la distribución de los componentes de la muestra entre dos disolventes inmiscibles (generalmente una fase acuosa y una orgánica) en los que matriz y analito tienen diferente solubilidad, de manera que tanto la eficacia como la selectividad del proceso dependen de la naturaleza de ambos disolventes. Experimentalmente, una vez puesta en contacto la muestra líquida con el disolvente adecuado y después de un período de agitación apropiado se separan ambas fases, durante el proceso el plaguicida se reparte entre ambos líquidos hasta alcanzar el equilibrio, cuya constante se conoce como coeficiente de distribución o partición. Este equilibrio químico se puede alterar de varios modos, de forma que la selectividad y la eficacia del proceso de extracción no sólo dependa de la elección del disolvente inmiscible, sino también de otros factores como el pH y la temperatura, la formación de pares iónicos y complejos con iones metálicos, la adición de sales a la fase acuosa para reducir la solubilidad del analito (efecto de *salting-out*), etc.

La elección de los disolventes orgánicos utilizados en LLE se realiza atendiendo a la polaridad del plaguicida, a su compatibilidad con la técnica analítica a utilizar posteriormente, a la inmiscibilidad de ambas fases y a su volatilidad, ya que la preconcentración o enriquecimiento se lleva a cabo tras la evaporación del disolvente orgánico. Además, los disolventes empleados deben permitir obtener un valor elevado de la constante de distribución para los plaguicidas de interés, aumentando su concentración en la fase orgánica.

Por tanto, las principales ventajas asociadas a la LLE son:

- Gran versatilidad, como consecuencia del amplio rango de disolventes y mezclas de los mismos que se pueden emplear.

- Simplicidad, al no requerir el uso de instrumentación compleja ni de consumibles costosos, a excepción de los disolventes empleados.
- Posibilidad de llevar a cabo la técnica de cuatro formas distintas: extracción discontinua (en una o varias etapas), continua, en contracorriente y en línea (Cela y col., 2002). La elección de una u otra dependerá de las características de la muestra, de los analitos y de las constantes de distribución.

Estas ventajas han hecho que la LLE se haya aplicado ampliamente a la extracción de plaguicidas de diversas matrices, tanto medioambientales como alimentarias y biológicas, tal como puede observarse en distintos artículos de revisión (Ahmed, 2001; Beyer y Biziuk, 2008). Sin embargo a pesar de sus ventajas, la LLE presenta una serie de inconvenientes, entre los que destaca el empleo de grandes volúmenes de disolventes orgánicos (aunque en la extracción en línea se utilizan menores cantidades), lo que requiere su posterior evaporación para concentrar los extractos. Además, en muestras que contienen tensioactivos o grasas se producen emulsiones que en ocasiones son difíciles de romper por lo que, a veces, es necesario centrifugar, filtrar, añadir sales o pequeñas cantidades de otros disolventes. Otra desventaja importante de la LLE es la necesidad, en muchos casos, de introducir una etapa de limpieza, principalmente cuando se trata de matrices muy complejas, ya que en esta etapa pueden extraerse compuestos interferentes junto con los analitos. Todo ello hace de la LLE una técnica cara, lenta, contaminante y tediosa, que está siendo desplazada poco a poco por otras técnicas de extracción alternativas.

En los últimos años se han introducido nuevos avances en la aplicación de la extracción líquido-líquido para la determinación de plaguicidas en diversas matrices. Es el caso de la extracción en el punto de nube, *cloud point extraction* (CPE) y la microextracción líquido-líquido (LLME o LPME) entre otras, que se describen brevemente a continuación.

I.3.1.1 Extracción en el punto de nube

La separación de fases que experimentan algunos medios micelares (comúnmente conocida como CPE) ofrece una alternativa a los métodos convencionales de extracción tales como la LLE, puesto que se trata de una técnica sencilla y económica. La CPE se basa en la propiedad que presenta la mayor parte de tensioactivos no iónicos y zwitteriónicos de formar micelas en disolución acuosa una vez que su concentración sobrepasa un determinado valor, conocido como concentración micelar crítica (CMC). Las micelas formadas pueden presentar diferentes estructuras en función de la naturaleza y concentración del tensioactivo y disolvente utilizado, como microemulsiones, monocapas, bicapas, etc. (Moroi, 1992) y pueden disolver solutos de diferente naturaleza.

El calentamiento de una disolución micelar de un tensioactivo no iónico o zwitteriónico por encima de un valor determinado, conocido como temperatura de punto de nube, conduce a la separación de dos fases isotrópicas, una de ellas rica en el tensioactivo (en la que permanecen los analitos) y la otra acuosa, que contiene dicho tensioactivo a una concentración próxima a la CMC. Esta separación de fases es reversible, de manera que mediante una disminución de la temperatura, las dos fases convergen para formar de nuevo una única fase. La temperatura a la que se observa el punto de nube depende principalmente de la concentración y naturaleza del tensioactivo y de la presencia de aditivos como sales, ácidos, bases, polímeros, etc. (Carabias-Martínez y col., 2000).

La mayor parte de las aplicaciones de la CPE se localizan en la extracción y preconcentración de iones metálicos (Willoud y col., 2002; Sun y col., 2006), moléculas de interés biológico, fundamentalmente proteínas (Soriano-Lopes y col., 2007; Monteiro y col., 2008) y contaminantes, entre ellos plaguicidas (Evdokimov y van Wandruszka, 1998; Carabias-Martínez y col., 1999, 2000, 2003a; Jia y col., 2008; Chen y col., 2008b).

En lo que respecta a la determinación de plaguicidas, la mayor parte de las aplicaciones de la CPE en este campo se han descrito como etapa previa a la

cromatografía de líquidos, principalmente en aguas (Moreno-Cordero y col., 1998; Padrón-Sanz y col., 2004), aunque también existen aplicaciones en otras matrices, como suelos (Evdokimov y van Wandruszka, 1998) y alimentos (Chen y col., 2008b). Sin embargo, en el campo de la GC y la CE se han desarrollado muy pocos trabajos. En lo que respecta a la GC, recientemente se ha publicado un trabajo en el que se aplica la CPE como etapa de extracción de 5 plaguicidas organofosforados en orina humana previamente a su determinación por GC (Jia y col., 2008). En cuanto a la CE, existen algunos trabajos referentes a la extracción de plaguicidas mediante CPE, concretamente en aguas (Carabias-Martínez y col., 1999, 2003a).

1.3.1.2 Microextracción líquido-líquido

Otro de los avances llevados a cabo para minimizar la cantidad de disolvente orgánico utilizado en la preparación de la muestra, así como para simplificar y miniaturizar dicha etapa es la aplicación de la microextracción líquido-líquido (LLME), también conocida como microextracción en fase líquida (LPME). Dicha técnica se basa en una miniaturización de la LLE convencional, ya que sólo son necesarios μL de disolvente en lugar de los cientos de mL utilizados en LLE. Por tanto, se trata de una técnica de bajo coste, rápida, simple, poco contaminante, aplicable a muestras sólidas y líquidas y de fácil automatización.

La extracción de plaguicidas de muestras sólidas y líquidas por LPME puede llevarse a cabo mediante diversos modos de extracción (Lambropoulou y Albanis, 2007b). En general, un pequeño volumen de disolvente orgánico extrae a los analitos de la fase acuosa en la que se encuentran. Convencionalmente, dicha fase orgánica puede consistir en una microgota suspendida de la aguja de una jeringa (microextracción en gota, SDME) o bien encontrarse en los microporos de una membrana hidrofóbica (microextracción líquido-líquido en membrana, HF-LPME). Recientemente, se ha introducido la microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME) como un novedoso modo de LPME. En este caso, el pequeño volumen de disolvente orgánico de extracción se inyecta en la muestra acuosa a alta velocidad junto con un medio dispersor miscible (generalmente acetonitrilo, metanol o acetona) de manera que, tras agitar vigorosamente y centrifugar, los analitos

quedan retenidos en el disolvente de extracción decantado. Por tanto, comparada con la LPME convencional, la DLLME evita la volatilización y pérdida de los agentes de extracción, proporcionando una mejora en la sensibilidad y reproducibilidad, así como una simplificación en el procedimiento de extracción. En los últimos años se han utilizado los líquidos iónicos en LPME, principalmente en DLLME, actuando como agentes de extracción menos tóxicos y contaminantes respecto de los convencionales (Lambropoulou y Albanis, 2007b).

La LPME en sus diferentes modos de extracción se ha utilizado en numerosas ocasiones para la extracción y preconcentración de plaguicidas en diversas matrices (medioambientales, biológicas y alimentarias) en combinación con la GC y HPLC. La Tabla I.3.2 muestra algunos ejemplos recientes de esta aplicación.

I.3.2 Extracción sólido-líquido

La extracción sólido-líquido ha sido tradicionalmente el proceso más utilizado para la extracción de plaguicidas de muestras sólidas. Se basa en la puesta en contacto de una cantidad determinada de muestra con un disolvente o mezcla de disolventes adecuados. Posteriormente, la mezcla se somete a distintos procesos (calentamiento, ultrasonidos, agitación, alta presión, etc.) cuya agresividad depende de la fortaleza de las interacciones plaguicida-matriz. Este procedimiento de extracción debe ser optimizado en cada aplicación, tratando de emplear unas condiciones de compromiso que permitan obtener una extracción cuantitativa de los analitos y, a la vez, la menor posible de otros compuestos no deseados de la matriz.

Entre las técnicas de extracción sólido-líquido utilizadas convencionalmente para el análisis de plaguicidas por GC, HPLC o CE destacan (Cámara y col., 2002):

Tabla 1.3.2 Aplicaciones recientes de la LPME en combinación con GC y HPLC para el análisis de plaguicidas en diversas matrices.

Modo de LPME	Método analítico	Plaguicida y matriz	Disolvente de extracción	Referencia
SDME	GC	6 organofosforados en agua de lago y zumos de manzana, pera y naranja	Tolueno	Xiao y col., 2006
	HPLC	Foxím en aguas de lago y de consumo humano	<i>n</i> -hexano	Liang y col., 2005
HF-LPME	GC	6 organoclorados en infusión y hoja de té	1-octanol	Huang y Huang, 2006
	HPLC	23 plaguicidas polares en pepino, tomate y pimienta	Acetato de etilo	Romero-González y col., 2006
DLLME	GC	Piretroides en aguas de pozo, de río y de consumo humano	Clorobenceno	Xiao-Huan y col., 2008
	HPLC	Carbaril y triazofos en agua de consumo humano y en zumos de manzana, uva y melocotón	Tetracloroetano	Fu y col., 2009
DLLME con líquidos iónicos	GC	-	-	-
	HPLC	Metil-paratión y foxím en aguas de lluvia, subterránea, de embalse y de río	[C ₆ MIm][PF ₆]*	Zhou y col., 2008a

* [C₆MIm][PF₆]: Hexafluorofosfato de 1-hexil-3-metilimidazolio.

- Extracción Soxhlet, en la que la muestra se coloca en una carcasa porosa y el disolvente recircula continuamente a través de ella mediante un sistema de destilación-condensación. Se trata de un método estándar, independiente del tipo de matriz, de bajo coste y en el que no es necesaria la filtración posterior del extracto obtenido. Sin embargo, los principales inconvenientes son el largo tiempo necesario para completar la extracción (12-48 h) y la gran cantidad de disolventes orgánicos empleados (300-500 mL), lo que supone un gasto significativo además de un problema ambiental. Además, el calentamiento continuo durante largos períodos de tiempo a medida que se extraen los plaguicidas es otro factor a tener en cuenta, especialmente en el caso de plaguicidas termolábiles, que pueden sufrir procesos de degradación. Con objeto de disminuir el tiempo de extracción, se han diseñado varios equipos que permiten automatizar la extracción Soxhlet. Entre ellos destaca el equipo comercial llamado Soxtec[®] System HT, con el cual se consiguen resultados

similares a los obtenidos con la extracción Soxhlet convencional pero con una considerable reducción en el tiempo de extracción (30-60 min) y en el volumen de disolvente (Cela y col., 2002). La extracción Soxhlet se ha utilizado ampliamente para la extracción de plaguicidas de diversas matrices (Dean y Xiong, 2000; Beyer y Biziuk, 2008), sin embargo, sus principales desventajas han hecho que se utilicen en mayor medida otras técnicas de extracción alternativas.

- MAE, en la que la muestra se coloca junto con el disolvente en un reactor y la mezcla se calienta con energía de microondas. Esta técnica es una alternativa a la extracción Soxhlet, ya que el calentamiento de la muestra se consigue de una forma inmediata y más eficaz y el consumo de disolventes es bajo. Además, se trata de una técnica automática permitiendo, en muchos casos, la extracción de hasta 24 muestras simultáneamente. En general, las recuperaciones obtenidas mediante MAE son comparables a las conseguidas mediante extracción Soxhlet, por lo que la reducción en el consumo de disolventes y del tiempo empleado ha provocado un mayor uso de la MAE en la extracción de plaguicidas de diferentes matrices, como muestra el amplio número de publicaciones al respecto (Bélanger y Paré, 2006; Carro y col., 2006). Una variante de esta técnica que se ha aplicado de manera más reciente en la determinación de plaguicidas (Mahugo-Santana y col., 2005) es la extracción micelar asistida por microondas (MAME), en la que se sustituyen los disolventes orgánicos convencionales por sistemas micelares, lo cual implica el uso de tensioactivos. Las principales ventajas de la utilización de la MAME son, al igual que en la MAE convencional, la reducción del tiempo de extracción y de la cantidad de muestra requerida para el análisis, alto rendimiento de la extracción, bajo coste y, además, menor contaminación, al no utilizarse disolventes orgánicos tóxicos.
- Extracción asistida por ultrasonidos, en la que se utilizan ondas de ultrasonidos (bien introduciendo la muestra en un baño de ultrasonidos o bien sumergiendo una sonda de ultrasonidos en la misma) con el fin de agitar la muestra sumergida en un disolvente orgánico un cierto tiempo, generalmente de 3 a 60 minutos. Tras la extracción, se separa el disolvente orgánico con el analito extraído mediante centrifugación o filtración. Debido al aumento de

temperatura generado en el proceso de sonicación, la solubilidad y difusividad de los analitos aumenta, ya que se produce un incremento en la presión, favoreciendo la penetración del disolvente al interior del sólido y el transporte de los analitos. Como consecuencia, se acorta el tiempo de extracción. La sonicación se ha utilizado en numerosas ocasiones para la extracción de plaguicidas de matrices sólidas de distinta naturaleza (Dean y Xiong, 2000; Andreu y Picó, 2004; Beyer y Biziuk, 2008).

- PLE o ASE, en la que se emplean disolventes orgánicos convencionales a temperaturas y presiones elevadas, que permiten acelerar la cinética de la extracción y mantener al disolvente en estado líquido, dando lugar así a extracciones rápidas y seguras. Otras ventajas de esta técnica de extracción son el bajo consumo de disolventes orgánicos y la posibilidad de procesar hasta 24 muestras de forma secuencial. Sin embargo, la PLE o ASE supone un coste inicial elevado y su aplicación está limitada al tipo de matriz. En general, los resultados obtenidos con esta técnica son comparables o incluso mejores (especialmente en términos de precisión) que los conseguidos por métodos clásicos, por lo que su utilización en la extracción de plaguicidas cada vez es mayor. De hecho, la PLE o ASE se ha empleado en diversas ocasiones en el análisis de plaguicidas en distintas matrices sólidas mediante GC (Schreck y col., 2008), HPLC (Lesueur y col., 2008a) o CE (Carabias-Martínez y col., 2007).

En los últimos años se ha desarrollado una nueva técnica de preparación de muestras sólidas (frutas y verduras, generalmente), denominada QuEChERS (“*quick, easy, cheap, effective, rugged and safe*”) para el análisis multiresiduo de plaguicidas (Anastassiades y col., 2003). Esta técnica comprende varias etapas: extracción de la muestra sólida con un disolvente adecuado, generalmente acetonitrilo, partición líquido-líquido tras la adición de NaCl y MgSO₄ y limpieza y eliminación del agua residual mediante SPE dispersiva, al añadir una amina primaria/secundaria (PSA) y MgSO₄. Este procedimiento, que se ha aplicado en numerosas ocasiones a la determinación de plaguicidas en muestras sólidas, principalmente alimentarias, mediante GC (Walorczyk, 2008; Nguyen y col., 2008; Hernández-Borges y col., 2009) y en algunos casos mediante HPLC (Kruve y col., 2008; Lesueur y col., 2008b), está dando muy buenos resultados. Además, recientemente se ha aplicado el

QuEChERS a muestras líquidas como aceite de oliva (Cunha y col., 2007b), zumos (Furlani y col., 2008) y vino (Cunha y col., 2009).

1.3.3 Extracción en fase sólida

A pesar de que la LLE es una técnica efectiva para la extracción y preconcentración de muchos plaguicidas en diversas matrices, en los últimos años la SPE ha adquirido un papel relevante en este campo, como consecuencia de las numerosas ventajas que presenta: rapidez, amplia gama de fases estacionarias disponibles, manipulación simple y fácil automatización, empleo de volúmenes de disolventes orgánicos mucho menores a los empleados en LLE (lo que permite reducir costes y evitar la posterior evaporación de dichos disolventes), versatilidad, selectividad, factores de preconcentración elevados, etc. (Wells, 2003).

La SPE se basa en la extracción y preconcentración de los analitos de una fase líquida o gaseosa mediante su retención selectiva en una fase estacionaria sólida apropiada, seguida de la elución de los analitos retenidos mediante un disolvente orgánico adecuado. Las fases estacionarias empleadas en SPE están constituidas por partículas que presentan una gran afinidad por los analitos y generalmente se encuentran empaquetadas en el interior de pequeñas columnas, cartuchos cerrados o discos. Estas fases sólidas, cuyo uso depende de la estructura y propiedades de los analitos así como de la composición de la matriz de la muestra, son similares a las empleadas en LC, siendo las más comunes las de gel de sílice, silicato de magnesio (Florisil), carbón activo, alúmina, sílices enlazadas y polímeros como el poliestireno-divinilbenceno (PS-DVB) o el poli-divinilbenceno-N-vinilpirrolidona (cartuchos Oasis HLB).

La mayor parte de las aplicaciones de la SPE en la extracción de plaguicidas apolares están basadas en el empleo de cartuchos o columnas desechables empaquetadas, principalmente, con cadenas octadecil (C_{18}) ligadas a la sílice, unión químicamente estable en presencia de la mayoría de disolventes orgánicos. Sin embargo, el uso de este tipo de fases estacionarias presenta algunas limitaciones, como la presencia de grupos silanol que hayan podido quedar libres, las

retenciones débiles de plaguicidas polares y la baja estabilidad en medios muy ácidos o muy básicos (Picó y col., 2003). Estas limitaciones han dejado paso a la introducción de otros tipos de materiales adsorbentes, como los basados en polímeros orgánicos, que además de ser estables en todo el rango de pH, presentan una mayor eficacia a la hora de extraer compuestos orgánicos, debido a su mayor área superficial. Entre los polímeros de uso más común para la extracción de plaguicidas destaca el Oasis HLB, que es un polímero macroporoso obtenido a partir de los monómeros DVB (lipofílico) y vinilpirrolidona (hidrofílico), que proporcionan un balance hidrofílico-lipofílico adecuado para la retención de plaguicidas orgánicos polares, no polares y sus metabolitos presentes en muestras acuosas. Además, esta fase estacionaria proporciona rendimientos elevados y una alta estabilidad en todo el rango de pH.

La SPE se suele utilizar como etapa previa a la determinación analítica y entre sus objetivos principales destacan: enriquecimiento de trazas o preconcentración (muy útil cuando la concentración de los plaguicidas en la muestra se encuentra por debajo del LOD), limpieza o purificación de la muestra (con el fin de eliminar interferencias utilizando disolventes de lavado adecuados), almacenamiento de analitos inestables en un medio líquido o que tienen volatilidad elevada, fraccionamiento de la muestra en diferentes compuestos o grupos de éstos (eluyendo cada fracción con una fase líquida distinta) y llevar a cabo reacciones de derivatización entre los grupos reactivos del analito y los de la superficie del adsorbente (Cela y col., 2002).

En general, la SPE se puede utilizar conjuntamente con cualquier técnica analítica. Comúnmente, el procedimiento de SPE se realiza en el modo fuera de línea, aunque la tendencia actual hacia la miniaturización y automatización ha hecho que la SPE se pueda acoplar y operar en línea con el instrumento de medida, tanto cromatográfico (acoplamiento SPE-GC y SPE-HPLC) como no cromatográfico (acoplamiento SPE-CE). Estos acoplamientos en línea entre extracción y análisis aumentan la sensibilidad y la reproducibilidad y minimizan las posibles pérdidas de analito, con lo que su utilización resulta muy ventajosa. Esto se debe a que dichos acoplamientos requieren sistemas específicos que permitan realizar de forma

automatizada y a la vez independiente del sistema cromatográfico, las etapas de activación, paso de la muestra y lavado. Además, en el caso del acoplamiento en línea SPE-CE, los volúmenes de muestra introducidos son muy pequeños (en el rango de nL) con lo cual dicho acoplamiento se hace más complicado, de ahí que la mayoría de las aplicaciones se lleven a cabo en el modo fuera de línea. En lo que respecta al análisis de plaguicidas, en los últimos años se han utilizado estos tres acoplamientos en diversas ocasiones. Algunos ejemplos son los trabajos de Sasano y col. (2000), Brossa y col. (2003), Kerkdijk y col. (2007) en SPE-GC, o de Asperger y col. (2002), Koal y col. (2003), Chen y col. (2007a) en SPE-HPLC y de Hinsmann y col. (2000) en SPE-CE.

Una de las tendencias actuales para mejorar la SPE es el desarrollo de nuevas fases estacionarias que permitan una retención más selectiva de los plaguicidas. Con este objetivo, se ha estudiado la tecnología de impronta molecular, que permite obtener MIP muy estables que poseen propiedades de reconocimiento molecular selectivo, con lo que pueden utilizarse como fases estacionarias de SPE (Pichon y Chapuis-Hugon, 2008). Otro tipo de sustancias utilizadas recientemente son los nanotubos de carbono (CNTs), que han despertado un gran interés en la comunidad científica desde su descubrimiento por Iijima en 1991 (Iijima, 1991; Iijima e Ichihashi, 1993). Los CNTs pertenecen a la familia de los alótopos de carbono y pueden ser de pared sencilla (SWCNTs) o de pared múltiple (MWCNTs). Los SWCNTs están formados por una lámina de grafeno (formada por anillos hexagonales de átomos de carbono con hibridación sp^2), curvada y cerrada, mientras que los MWCNTs contienen varias unidades de SWCNTs concéntricos (Figura I.3.1).

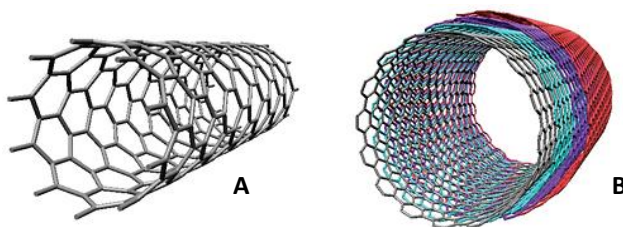


Figura I.3.1 Estructuras de los SWCNTs (A) y de los MWCNTs (B).

Teniendo en cuenta su estructura, los CNTs se presentan habitualmente formando agregados de diferente diámetro y son insolubles en agua, así como en la mayor parte de disolventes orgánicos, aunque exhiben una ligera solubilidad en dimetilformamida, dimetilacetamida y dimetilpirrolidona (Kim y col., 2006). Además, los CNTs presentan propiedades electrónicas, mecánicas y químicas muy atractivas; de hecho, su elevada conductividad, su resistencia a la tensión y su estabilidad química han hecho que se utilicen para muy diversas aplicaciones tecnológicas tales como baterías, transductores electroquímicos y sensores (Delgado y col., 2007). Desde el punto de vista de la Química Analítica, los CNTs presentan características muy útiles que les convierten en herramientas muy potentes para el desarrollo analítico. De hecho, su estructura única, caracterizada por una gran área superficial y una cavidad interna, junto con su gran habilidad para establecer interacciones electrostáticas π - π , facilitan la adsorción de los analitos de una manera selectiva y reproducible. Como consecuencia, los CNTs pueden ser utilizados como fases estacionarias de SPE muy efectivas (Valcárcel y col., 2007, 2008). Estos nuevos materiales, concretamente los MWCNTs, se han empleado, junto con los polímeros orgánicos Oasis HLB, en la presente Tesis Doctoral.

Los CNTs se han utilizado en Química Analítica como parte de nuevos sensores de gases (Dai y col., 2002), biosensores enzimáticos (Wang, 2005), voltametría (Li y col., 2005) e investigación del ADN (Chen y col., 2005). También se han utilizado para la extracción (SPE) de contaminantes, como dioxinas (Long y col., 2001), ftalatos (Cai y col., 2003), iones metálicos (Liang y col., 2004), clorofenoles (Cai y col., 2005), hidrocarburos aromáticos policíclicos, PAHs (Wang y col., 2007b) y plaguicidas (El-Sheikh y col., 2008) de distintas matrices, principalmente de aguas. En la Tabla I.3.3 se muestran los estudios realizados sobre la aplicación de los CNTs como fases estacionarias de SPE para la extracción y preconcentración de plaguicidas de distintas matrices. Como puede observarse, las técnicas analíticas más empleadas han sido GC y HPLC y la gran mayoría de las aplicaciones se han realizado en aguas. Sólo existen cuatro trabajos llevados a cabo en otro tipo de muestras, concretamente en extractos de ajo (Du y col., 2008), suelos (Min y col.,

2008), aceite de oliva virgen (López-Feria y col., 2009) y lodos de depuradora (Basheer y col., 2006).

I.3.3.1 Dispersión de la matriz en fase sólida

Como se ha comentado, en la actualidad existe un interés creciente por la simplificación y miniaturización de las técnicas de análisis, con la consiguiente reducción de la cantidad de muestra utilizada en la extracción y del consumo de disolventes orgánicos, lo que lleva al desarrollo de técnicas alternativas para la preparación de la muestra en el análisis de plaguicidas, como la dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD). Dicha técnica permite la extracción y preconcentración de los plaguicidas de matrices sólidas, semisólidas y/o altamente viscosas (Barker, 2007). Además, especialmente en su aplicación a muestras biológicas, permite obtener secuencialmente distintas fracciones ricas en un determinado tipo de compuestos mediante el empleo de disolventes de polaridad creciente. En MSPD, una pequeña cantidad de muestra (generalmente 0,5 g) se disgrega y se mezcla con una cantidad similar de una fase sólida de extracción adecuada hasta conseguir una mezcla homogénea, que se coloca en un cartucho de extracción para su posterior elución con ayuda de un disolvente orgánico apropiado. La elección de la fase sólida y del disolvente a utilizar depende de la polaridad del analito y del tipo de muestra a analizar. En general, las fases sólidas utilizadas para la extracción de los plaguicidas coinciden con muchas de las empleadas en SPE: C₈, C₁₈, Florisil, etc. Además, el empaquetamiento previo del cartucho con otra fase sólida de polaridad diferente permite la retención de las interferencias de la matriz, aumentando así la limpieza del extracto.

Por tanto, la MSPD es una técnica sencilla, de bajo coste, versátil, de bajo consumo de muestra y disolventes, rápida y selectiva (Baker, 2007; García-López y col., 2008), que se ha utilizado ampliamente en los últimos años para la extracción y preconcentración de plaguicidas en diversas matrices mediante GC (Cunha y col., 2007a; Sánchez-Brunete y col., 2008; Dantas-Silva y col., 2008), HPLC (García de Llasera y col., 2005; Totti y col., 2006; Radisic y col., 2009) y en menor medida mediante CE (Blanco y col., 2006; Moreno y col., 2008).

Tabla 1.3.3 Aplicación de los CNTs como fases estacionarias de SPE para la extracción y preconcentración de plaguicidas.

Plaguicida	Matriz	CNTs y diámetro externo	Técnica analítica y detección	LOD	Referencia
Thiametoxam, imidacloprid y acetamiprid	Aguas de consumo humano, subterránea y de presa	MWCNTs; 30-60 nm	HPLC-UV	5,4-6,7 ng/L	Zhou y col., 2006a
Nicosulfurón, metil-tifensulfurón y metil-metsulfurón	Aguas de pozo, de consumo humano, de presa y de mar	MWCNTs; 30-60 nm	HPLC-DAD	5,90-11,2 ng/L	Zhou y col., 2006b
DDT, DDD y DDE	Aguas de consumo humano, subterránea y de presa	MWCNTs; 30-60 nm	HPLC-UV	4-13 ng/L	Zhou y col., 2006c
Atrazina y simazina	Aguas de río, de presa, de consumo humano y residual	MWCNTs; 30-60 nm	HPLC-DAD	33 y 9 ng/L, respectivamente	Zhou y col., 2006d
7 plaguicidas organofosforados	Lodos de depuradora	MWCNTs; -	GC-MS	1-7 pg/g	Basheer y col., 2006
Dicamba	Agua de río	MWCNTs; 5-10 nm	HPLC-DAD	2 µg/L	Biesaga y Pyrzyńska, 2006
Cianazina, clorotolurón y clorbenzeturón	Aguas de consumo humano, subterránea, residual y de nieve	MWCNTs; 30-60 nm	HPLC-UV	12-34 ng/L	Zhou y col., 2007a
8 plaguicidas organoclorados	Aguas residual y de lago	SWCNTs; -	GC-ECD	0,190-3,77 ng/L	Lü y col., 2007
Atrazina, propoxur y metidatión	Agua de consumo humano, de presa y de manantial	MWCNTs; 10-20 nm	HPLC-DAD	37,5-220 ng/L	El-Sheikh y col., 2007
12 plaguicidas de distintas familias	Aguas Milli-Q, de consumo humano y de río	MWCNTs; 40-60 nm	GC-MS	10-30 ng/L	Wang y col., 2007a

4 fungicidas y un herbicida	Aguas de consumo humano, subterránea, de lluvia y de presa	MWCNTs; 30-60 nm	HPLC-UV	2,99-6,94 ng/L	Zhou y col., 2007b
Triasulfurón y metil-bensulfurón	Aguas de consumo humano, de pozo, de mar y de presa	MWCNTs; 30-60 nm	HPLC-DAD	22,4 y 2,90 ng/L, respectivamente	Zhou y col., 2007c
Diazinón	Agua de consumo humano	MWCNTs; 3-10 nm	HPLC-UV	60 ng/L	Katsumata y col., 2008
Metil-paratión	Extracto de ajo	MWCNTs; -	Análisis voltamétrico	5 µg/L	Du y col., 2008
Atrazina, propoxur y metidatión	Aguas de consumo humano, de presa y de manantial	MWCNTs; 40-60 nm	HPLC-DAD	36-220 ng/L	El-Sheikh y col., 2008
Atrazina, dietilatrazina y deisopropilatrazina	Agua y suelo	MWCNTs; 40-60 nm	GC-MS	0,02-1,0 µg/kg	Min y col., 2008
Diclorán, simazina, atrazina y metazaclor	Agua de consumo humano	MWCNTs; -	HPLC-UV	5-15 ng/L	Al-Degs y Al-Ghouti, 2008
Fenpropatrín, cialotrín y deltametrin	Aguas de consumo humano, de río, de presa y de pozo	MWCNTs; 30-60 nm	HPLC-UV	1,3-4,3 ng/L	Zhou y col., 2008c
5 herbicidas	Aguas de consumo humano, de río y de pozo	SWCNTs; 1,5-2,5 nm	HPLC-DAD	1,1-7,2 ng/L	Niu y col., 2009
8 plaguicidas de distintas familias	Aceite de oliva virgen	SWCNTs funcionalizados; 1-2 nm	GC-MS	1,5-3,0 µg/L	López-Feria y col., 2009

De hecho, se han realizado estudios en matrices biológicas, como grasas de animales (Furusawa, 2004; Furusawa, 2005), tejidos de animales (Cheng y col., 2009) e hígados de animales (Garrido-Frenich y col., 2007), en matrices medioambientales, como suelos (Shen y col., 2005, 2006) y lodos de aguas residuales (Sánchez-Brunete y col., 2008), así como en matrices alimentarias, como frutas (Bogialli y col., 2004b; Soler y col., 2005; Dantas-Silva y col., 2008), zumos de frutas (Radisic y col., 2009), vegetales (Bogialli y col., 2004b), cereales (Dorea-Haroldo y Lima-Sobrinho, 2004; Michel y col., 2006), huevos (Valsamaki y col., 2006), miel (Totti y col., 2006), leche (Bogialli y col., 2004a), etc.

A pesar de las numerosas ventajas de la SPE y de la MSPD sobre la LLE, en particular el empleo de volúmenes mucho menores de disolventes orgánicos, es necesario destacar que en muchos casos se siguen utilizando volúmenes relativamente grandes. Además, el proceso de preparación sigue siendo laborioso.

1.3.4 Microextracción en fase sólida

La SPME constituye una técnica de pretatamiento de muestras bastante utilizada en la actualidad, debido a las numerosas ventajas que presenta (Gonçalves y Alpendurada, 2002; Lambropoulou y Albanis, 2007a). De hecho, a diferencia de la LLE o la SPE, puede utilizarse como técnica de muestreo in situ, integrando en un único paso las etapas de extracción y preconcentración y utilizando menores cantidades de disolventes orgánicos. Por tanto, es una técnica muy simple, rápida, de fácil operación, versátil, adecuada para realizar análisis de campo y que puede utilizarse en combinación con los diferentes instrumentos de análisis existentes, permitiendo su automatización (Beltrán y col., 2000). Sin embargo, la SPME presenta algunos inconvenientes, como la fragilidad, precio y tiempo de vida de la fibra y la obtención de factores de preconcentración inferiores a los obtenidos mediante SPE.

La SPME se basa en la extracción de los analitos de la matriz de la muestra mediante una fibra de sílice fundida recubierta de una fase sólida adsorbente, generalmente polimérica, seguida de la desorción de dichos analitos para su

análisis (Alpendurada, 2000). El pequeño tamaño de la fibra y su geometría cilíndrica permiten incorporarla en una jeringa, facilitando así su manipulación y al mismo tiempo protegiendo la fibra cuando no se utiliza, ya que ésta permanece dentro de la aguja de la jeringa. La etapa de extracción de la muestra puede llevarse a cabo de dos maneras: sumergiendo directamente la fibra en la disolución problema (inmersión directa, DI-SPME) o bien manteniéndola en el espacio en cabeza que está en equilibrio con dicha disolución (HS-SPME). Una vez transcurrida la etapa de extracción, tiene lugar la desorción térmica de los analitos o bien la desorción mediante la adición de un disolvente orgánico, dependiendo de la técnica analítica a utilizar con posterioridad, generalmente GC y HPLC, respectivamente.

Actualmente, existen fibras con diferentes recubrimientos, de manera que la SPME se puede utilizar para la determinación de un amplio número de compuestos. Los primeros recubrimientos comercializados fueron los de polidimetilsiloxano (PDMS) y poliácido (PA). Sin embargo, los tipos de recubrimiento han ido aumentando progresivamente y actualmente cubren un amplio conjunto de aplicaciones. Las fibras comercializadas más comunes son, además de PDMS y PA, sus combinaciones con DVB, carboxen (CAR, carbono activo), carbowax (CW, polietilenglicol) y resina templada (TPR), es decir, PDMS/DVB; DVB/CAR/PDMS; CAR/PDMS, CW/DVB y CW/TPR. La elección del tipo de fibra se basa en la naturaleza físico-química del analito a extraer teniendo en cuenta, fundamentalmente, su polaridad y su volatilidad. En general, las fibras de PDMS y PA son adecuadas para la extracción de analitos apolares y polares, respectivamente. Las fibras en las que se combina más de un polímero, son las más adecuadas para la determinación de analitos volátiles ya que, a diferencia de las fibras de PDMS y PA, la principal interacción entre la fibra y los analitos se produce por adsorción, ya que son polímeros sólidos (Pawliszyn, 1997; Gorecki y col., 1999). En la Figura I.3.2 se muestran las reglas generales que se pueden aplicar para la selección de la fibra más adecuada para cada aplicación en función de la polaridad y volatilidad de los analitos (Pawliszyn, 1997).

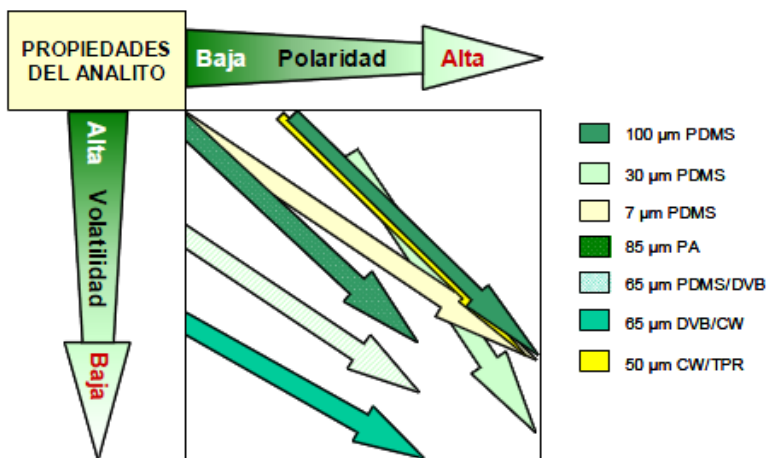


Figura I.3.2 Guía de selección de algunas fibras comercializadas de SPME. Adaptado de Pawliszyn, 1997.

El proceso de SPME se puede ver afectado por una serie de variables experimentales que pueden ser modificadas para incrementar la eficacia de los procesos de extracción y desorción. Entre estas variables se encuentran la agitación de la muestra, que aumenta la difusión de los analitos desde la matriz a la fibra o al espacio en cabeza, el tiempo y la temperatura de extracción, que se deben controlar de forma rigurosa para alcanzar una buena reproducibilidad, el tipo y volumen de disolvente de desorción (si la desorción es por disolvente orgánico), o bien la temperatura y tiempo de desorción (si la desorción es térmica) y la propia muestra: volumen, pH, adición de sales (*salting-out*) y de algún disolvente orgánico. Como consecuencia, se hace necesaria una adecuada y cuidadosa estrategia de optimización, que normalmente se lleva a cabo variando un solo factor a la vez y tomando como función respuesta las áreas de cada analito o los porcentajes de extracción, o bien utilizando técnicas quimiométricas (Salafranca y col., 2003; Frías y col., 2004).

Debido a las buenas características que presenta la SPME como técnica de preparación de muestras, en la actualidad se ha convertido en rutinaria en muchos laboratorios combinada, principalmente, con las técnicas cromatográficas de uso más habitual, como la GC y HPLC. En este sentido, la SPME se ha utilizado en el análisis clínico, forense, medioambiental, alimentario, biomédico, etc. con gran

éxito, aunque su área de aplicación por excelencia sigue siendo el análisis medioambiental (Pawliszyn, 1997). En lo que respecta al análisis de plaguicidas, son numerosos los trabajos presentes en la bibliografía acerca de la combinación de la SPME con las técnicas cromatográficas, en particular con la GC (Beltrán y col., 2000) y especialmente en muestras medioambientales como aguas (Sánchez-Ortega y col., 2005; Raposo-Júnior y Ré-Poppi, 2007) y suelos (Lambropoulou y Albanis, 2004; Fernández-Álvarez y col., 2008a), aunque también en muestras alimentarias (Cortés-Aguado y col., 2008; Parrilla-Vázquez y col., 2008) y biológicas (Cai y col., 2004; Tsoukali y col., 2005). En la mayor parte de las aplicaciones, el acoplamiento se realiza fuera de línea, aunque también se han descrito estudios sobre el acoplamiento en línea de la SPME con la GC (Cortés-Aguado y Sánchez-Morito, 2007) y HPLC (Takino y col., 2001).

Además de combinarse con GC y HPLC, también se ha estudiado el acoplamiento, tanto fuera de línea como en línea, de la SPME con la CE. En cualquier caso, son muy pocos los trabajos que existen en la bibliografía sobre el acoplamiento SPME-CE, especialmente en línea, debido a la complejidad del acoplamiento (Nguyen y Luong, 1997; Wang y Pawliszyn, 1998). La Tabla I.3.4 muestra las aplicaciones de la SPME al análisis de plaguicidas llevadas a cabo hasta el momento utilizando la CE como técnica de separación.

Las tendencias actuales de la SPME se basan, fundamentalmente, en el desarrollo de nuevas fases estacionarias, teniendo en cuenta factores como la polaridad de los analitos a extraer, que debe ser similar a la del recubrimiento y la resistencia a condiciones físicas y químicas extremas (altas temperaturas y pHs, presencia de disolventes orgánicos, alto contenido de sales, etc.), para asegurar una estabilidad y reproducibilidad adecuadas. En este sentido, se han desarrollado nuevos recubrimientos para SPME más selectivos y biocompatibles. Entre los más relevantes destacan los MIP (Mullett y Pawliszyn, 2003; Turiel y col., 2007; Djozan y Ebrahimi, 2008), los polímeros de polipirrol (Wu y Pawliszyn, 2001; Mullett y Pawliszyn, 2003) y los inmunoabsorbentes (Yuan y col., 2001; Mullett y Pawliszyn, 2003). Algunos de estos recubrimientos, como los MIP, se han aplicado en los últimos años al análisis de plaguicidas (Turiel y col., 2007; Djozan y Ebrahimi, 2008).

También se ha estudiado muy recientemente el empleo de líquidos iónicos poliméricos como fases estacionarias para SPME, ya que exhiben estabilidad térmica, largos tiempos de vida y eficacias de extracción reproducibles (Liu y col., 2005a; Zhao y col., 2008).

Tabla I.3.4 Aplicaciones del acoplamiento SPME-CE en el análisis de plaguicidas.

Plaguicida	Matriz	Tipo de fibra	Modo de aplicación	Detección	Referencia
4 herbicidas y un fungicida	Naranja, manzana, uva y tomate	CW/TPR 50 µm	Fuera de línea, inmersión directa	MS	Rodríguez y col., 2003
11 herbicidas	Agua subterránea	PDMS/DVB 60 µm	Fuera de línea, inmersión directa	UV	Frías-García y col., 2004
3 fungicidas y 2 insecticidas	Zumos de uva y naranja	PDMS/DVB 60 µm	Fuera de línea, inmersión directa	MS	Hernández-Borges y col., 2004b
3 fungicidas y 2 insecticidas	Aguas y zumos de manzana y naranja	PDMS/DVB 60 µm	Fuera de línea, inmersión directa	UV	Hernández-Borges y col., 2005a
4 fungicidas y un insecticida	Vino blanco	PDMS/DVB 60 µm	Fuera de línea, inmersión directa	UV	Molina-Mayo y col., 2007

La inmovilización de este tipo de recubrimientos poliméricos sobre la fibra de sílice fundida también se ha mejorado en los últimos años. De hecho, las fibras y los procedimientos utilizados convencionalmente plantean problemas de estabilidad térmica, resistencia, estabilidad en disolventes orgánicos y reproducibilidad, lo que dificulta en muchos casos su acoplamiento con las técnicas analíticas convencionales (Kumar y col., 2008). Para solventar estos problemas se ha incorporado la tecnología sol-gel, que permite una adecuada y duradera incorporación de compuestos orgánicos a estructuras inorgánicas poliméricas (Wang y col., 2000b; Mullett y Pawliszyn, 2003; Kumar y col., 2008). Los precursores sol-gel comúnmente utilizados son el tetrametoxisilano (TMOS) y el tetraetoxisilano (TEOS) y permiten obtener recubrimientos de polifenilmetilsiloxano (PPMS), polimetilsiloxano (PMS), PDMS y polietilenglicol (PEG), entre otros. Este último es uno de los más comunes y ha sido introducido recientemente para reemplazar a la fibra comercial CW/DVB (Risticvic y col., 2009).

I.3.4.1 Extracción sobre barra magnética agitadora

Otro avance llevado a cabo en SPME en los últimos años es el desarrollo de la SBSE. En dicha técnica, los analitos de interés se extraen introduciendo, directamente en la muestra o bien en el espacio en cabeza de la misma (HSSE), una barra magnética agitadora, comercializada con el nombre de Twister[®], recubierta de PDMS. Seguidamente, una vez retirada dicha barra de la muestra, se desorben los compuestos extraídos y se introducen en un dispositivo adecuado para su determinación: cromatógrafo de gases, si la desorción es térmica, cromatógrafo de líquidos o CE, si la desorción se realiza con disolventes orgánicos. La patente limita su uso a equipos desarrollados específicamente con ese fin.

La SBSE se basa en los mismos principios que la SPME, pero con la diferencia fundamental de que la cantidad de fase estacionaria que recubre a la barra magnética agitadora es mayor en comparación con las fibras de SPME (generalmente entre 55 y 300 μL de PDMS, mientras que las fibras de 100 μm de PDMS suelen tener 0,5 μL). Como consecuencia, la eficacia de la extracción aumenta considerablemente y, por tanto, también lo hacen los porcentajes de recuperación y la sensibilidad. Sin embargo, el principal inconveniente de la SBSE es su campo de aplicación, que está restringido a compuestos apolares, ya que hasta ahora sólo se comercializan barras magnéticas agitadoras con recubrimiento de PDMS. La tecnología sol-gel también se ha utilizado en la preparación de estas barras (a nivel de laboratorio) y se ha aplicado al análisis de *n*-alcanos, PAHs y plaguicidas organofosforados mediante GC (Liu y col., 2005b).

Actualmente, cada vez son más los estudios publicados en la bibliografía basados en SBSE y en particular en su aplicación al análisis de plaguicidas (Lancas y col., 2009). De hecho, se han descrito trabajos de GC (Ochiai y col., 2006; Pérez-Carrera y col., 2007; Maggi y col., 2008), HPLC (Blasco y col., 2004; Juan-García y col., 2004; Giordano y col., 2009) y CE (Juan-García y col., 2005b), especialmente en muestras alimentarias (Kende y col., 2004; Blasco y col., 2004; Juan-García y col., 2004; Liu y col., 2005b; Juan-García y col., 2005b; Zuin y col., 2006; Maggi y col., 2008; Viñas y col., 2008) y medioambientales (Ochiai y col., 2006; Rodil y Popp,

2006; El-Bakohuri y col., 2007; Pérez-Carrera y col., 2007; Guan y col., 2008; Ochiai y col., 2008; Giordano y col., 2009).

2. OBJETIVOS



II. OBJETIVOS

La presente Tesis Doctoral tiene como objetivo fundamental el desarrollo de nuevas metodologías analíticas para la determinación de plaguicidas utilizados en las Islas Canarias en muestras de agua y agroalimentarias (vinos, zumos, tomates y plátanos). Este objetivo principal incluye, también, la aplicación de diferentes métodos de separación como GC, HPLC y CE, acordes con las exigencias que demanda la legislación en materia de residuos de plaguicidas. Además de este objetivo principal, se han marcado los siguientes objetivos específicos:

- Utilizar diferentes técnicas de preconcentración fuera de línea (extracción asistida por ultrasonidos, SPE, SPME y DLLME) para incrementar la sensibilidad y selectividad de las determinaciones analíticas por GC, HPLC y CE.
- Aplicar técnicas de preconcentración en línea (técnicas de *stacking*) con objeto de mejorar la sensibilidad obtenida en las separaciones por CE.
- Estudiar las posibilidades que ofrece el uso de nuevas fases estacionarias para SPE, como los MWCNTs, y nuevos disolventes de extracción para DLLME, como los líquidos iónicos, para la extracción de plaguicidas de aguas y productos agroalimentarios.
- Investigar el uso del diseño experimental como herramienta matemática para la optimización de las condiciones de extracción durante la etapa de preparación de muestra.
- Validar las metodologías analíticas desarrolladas a partir de los correspondientes estudios de repetibilidad, calibración, recuperación, precisión y exactitud, así como determinar los correspondientes LODs y LOQs.
- Aplicar las metodologías analíticas desarrolladas al análisis de aguas y productos agroalimentarios procedentes de las Islas Canarias, con objeto de demostrar su validez y evaluar la posible distribución de estos plaguicidas en dichos productos.

3. PARTE EXPERIMENTAL



III. PARTE EXPERIMENTAL

III.1 Reactivos y disoluciones

- Carbendazima, pirimicarb, metalaxil, pirimetanil, procimidona, nuarimol, azoxistrobin, tebufenocida, fenarimol, benalaxil, penconazol y tetradifón, Riedel-de Haën, calidad Pestanal[®] (pureza >99,0%). Las disoluciones de cada plaguicida se prepararon en metanol (1,0 mg/mL excepto la carbendazima, que fue de 0,25 mg/mL) y se conservaron en el frigorífico a 4°C, preparando a diario las disoluciones de trabajo por diluciones apropiadas.
- Etoprofos, diazinón, metil-clorpirifos, fenitrotión, malatión, clorpirifos, fenamifos y buprofezín, Riedel-de Haën, calidad Pestanal[®] (pureza >93,1%). Trifenil fosfato (TPP, estándar interno), Fluka (pureza >98,0%). Las disoluciones de cada plaguicida y del estándar interno se prepararon en ciclohexano (150 mg/L y 2,6 mg/L, respectivamente) y se conservaron en el frigorífico a 4°C, preparando a diario las disoluciones de trabajo por diluciones apropiadas.
- Tebuconazol y oxifluorfen, Fluka, calidad Pestanal[®] (pureza >99,6%). Metiltiofanato, carbofurano, carbaril, iprodiona, hexitiazox y fenazaquin, Riedel-de Haën, calidad Pestanal[®] (pureza >98,0%). Las disoluciones de cada plaguicida se prepararon en acetonitrilo (500 mg/L) y se conservaron en el frigorífico a 4°C, preparando a diario las disoluciones de trabajo por diluciones apropiadas.
- Dodecil sulfato sódico (SDS), ácido fosfórico, ácido bórico, sulfato de magnesio anhidro, citrato trisódico dihidratado, citrato disódico sesquihidratado, Sigma-Aldrich, p.a.
- Cloruro sódico, sulfato sódico anhidro, Merck, p.a.
- Nanotubos de carbono de pared múltiple de 10-15 nm de diámetro externo, 2-6 nm de diámetro interno y 0,1-10 µm de longitud, Sigma-Aldrich. Previamente a su utilización, los MWCNTs se secaron en estufa a 120°C durante 2 horas y se dejaron enfriar en un desecador.
- Hexafluorofosfato de 1-hexil-3-metilimidazolio ([C₆MIm][PF₆]) y hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazolio ([C₄MIm][PF₆]), Fluka (pureza >97,0%).

- Acetato de etilo, acetona, acetonitrilo (grado HPLC), ciclohexano, etanol absoluto, diclorometano, metanol, *n*-hexano, 1-propanol, 2-propanol, Merck, Sharlau, Panreac y Fluka, p.a.
- Agua Milli-Q[®], obtenida de un sistema Milli-Q Gradiente A10, Millipore.
- Disoluciones de hidróxido sódico 0,1 M y 1 M, preparadas a partir de hidróxido sódico, Merck, p.a.
- Disolución de ácido clorhídrico 1 M, preparada a partir de ácido clorhídrico 25%, Merck, p.a.

III.2 Equipos e instrumentos

III.2.1 Equipo de GC

Para los experimentos realizados en GC se utilizó un equipo Varian 3800 (Walnut Creek, CA, USA, Figura III.2.1) equipado con detectores NPD y FID, así como un inyector automático Varian 8200. La adquisición, almacenamiento y procesado de datos se realizaron a partir del software propio del equipo (Varian Star Workstation, versión 6.41). Las separaciones se llevaron a cabo utilizando una columna capilar de sílice fundida Equity™-5 de 30 m x 0,25 mm y 0,25 μ m de espesor (Supelco, Bellefonte, PA, USA).



Figura III.2.1 Imagen del equipo GC utilizado en esta Tesis Doctoral.

III.2.2 Equipo de HPLC

Todas las experiencias de HPLC se realizaron en un equipo Alliance® de Waters (Milford, MA, USA, Figura III.2.2) equipado con un detector de diodos integrados (modelo 2996), una bomba binaria modelo 1525 y un inyector automático (modelo 717 plus). La adquisición, almacenamiento y procesamiento de datos se realizó con el software propio del equipo (Empower, versión 2). La columna utilizada fue una Nova-Pak® C₁₈ de 150 mm x 3,9 mm y partículas de 4 µm de diámetro y la precolumna fue una Guard-Pak® C₁₈ de 4 µm, ambas de Waters.



Figura III.2.2 Imagen del equipo HPLC utilizado en esta Tesis Doctoral.

III.2.3 Equipo de CE

Todos los experimentos de CE se realizaron en un equipo P/ACE-5510 de Beckman (Fullerton, CA, USA, Figura III.2.3) equipado con un detector de diodos integrados y controlado por el programa System Gold, versión 8. Los capilares empleados fueron de sílice fundida con un diámetro interno de 50 µm, 57 cm de longitud total y 50 cm de longitud al detector (Composite Metal Services, Worcester, UK).



Figura III.2.3 Imagen del equipo CE utilizado en esta Tesis Doctoral.

III.2.4 Otros equipos e instrumentos

- Balanza de precisión Sartorius CP224S.
- pH-metro GLP22 Crison, con electrodo doble vidrio/calomelanos.
- Agitador magnético Agimatic-E, Selecta.
- Centrífuga para tubos de 50 mL, Selecta modelo Centronics.
- Agitador Vortex, Trade Raypa.
- Baño de ultrasonidos Selecta Ultrasonds.
- Rotavapor R-200 con baño termostático B-490, bomba de vacío V-500 y controlador de vacío V-800, Büchi.
- Sistema de purificación de agua previamente destilada Milli-Q[®] Gradient A10, Millipore.
- Cartuchos Oasis[®] HLB de 6 cm³ y 500 mg para SPE, Waters.
- Sistema de vacío Vac-Master IST, Waters, para la extracción con cartuchos de SPE.
- Dispositivo de extracción manual para SPME, Supelco.
- Fibras de SPME con recubrimiento de PA, 85 µm (GC/HPLC), Supelco.
- Fibras de SPME con recubrimiento de PDMS, 100 µm (GC/HPLC), Supelco.
- Fibras de SPME con recubrimiento de PDMS/DVB, 60 µm (HPLC), Supelco.

- Fibras de SPME con recubrimiento de CW/TPR, 50 μm (HPLC), Supelco.

III.3 Programas informáticos

- Programa Microsoft Office Excel 2003 y 2007 para la elaboración de hojas de cálculo, obtención de las rectas de calibrado y tratamiento de datos numéricos.
- Programa Microcal OriginPro 7.0 y Microsoft Office PowerPoint 2003 y 2007, para la representación de los electroferogramas y cromatogramas, así como para la preparación de las figuras.
- Programa StatGraphics Plus 5.1, para la elaboración y estudios de diseño experimental y para el procesado de datos.
- Programa CE Expert Beckman, que proporciona todo un conjunto de datos relacionados con el llenado del capilar, inyección, etc.
- Programa de adquisición de datos Varian Star Workstation 6.41, que permite controlar el equipo Varian 3800, visualizar en tiempo real los datos adquiridos, el cálculo e integración automática y manual, la identificación de picos en base a tiempos de retención, etc.
- Programa de adquisición de datos Empower 2, que permite controlar el equipo Alliance HPLC[®], visualizar en tiempo real los datos adquiridos, el cálculo e integración automática y manual, la identificación de picos en base a tiempos de retención, la comparación de los espectros de absorción de los diferentes analitos, etc.
- Programa de adquisición de datos System Gold 8, que permite controlar el equipo P/ACE, visualizar en tiempo real los datos adquiridos, el cálculo e integración automática y manual, la identificación de picos en base a tiempos de migración, la comparación de los espectros de absorción de los diferentes analitos, el cálculo de eficacias (para lo que se utilizó la función *suitability*), etc.

III.4 Muestras

Las muestras acuosas y agroalimentarias que se han analizado en las diferentes secciones que se presentan en el Capítulo IV de esta Tesis Doctoral, fueron las siguientes:

- Agua mineral, adquirida en distintos supermercados locales.
- Agua de suministro urbano, procedente de la localidad de Tacoronte (Tenerife).
- Agua de estanque, procedente de la localidad de Tegueste (Tenerife).
- Agua subterránea, procedente de una galería de la localidad de Adeje (Tenerife).
- Agua de escorrentía, procedente de una zona agrícola de las afueras de la localidad de La Laguna (Tenerife).
- Vinos blanco, rosado y tinto de diversa procedencia, adquiridos en mercados y bodegas locales.
- Tomates, adquiridos en mercados locales (producción agrícola regional).
- Zumos de manzana, uva, naranja y piña, adquiridos en distintos supermercados locales.
- Plátanos, adquiridos en mercados locales (producción agrícola regional).

III.5 Procedimientos experimentales

III.5.1 Procedimientos experimentales utilizados en las determinaciones por CE

Separación electroforética: La separación por MEKC se llevó a cabo utilizando un BGE compuesto por tetraborato sódico 100 mM y SDS 30 mM a pH 8,5, con un 6% (v/v) de 1-propanol. Tras la correspondiente etapa de pretratamiento, se inyectó la muestra disuelta en una mezcla 1:3 (v/v) agua:tetraborato sódico 100 mM a pH 8,5 y se aplicó el *stacking* en modo de polaridad invertida (REPSM).

Activación de los capilares: Antes de su utilización, los capilares de sílice fundida fueron activados haciendo pasar, mediante presión de 20 psi, una disolución de HCl 1,0 M durante 2 minutos. A continuación, se pasó agua Milli-Q durante otros 2 minutos y, seguidamente, una disolución de NaOH 0,1 M durante 5 minutos. Posteriormente, se pasó agua Milli-Q durante 2 minutos y, finalmente, el BGE durante otros 2 minutos.

Protocolo de lavado de los capilares: Con objeto de obtener una buena repetibilidad de los diferentes métodos descritos en el Capítulo IV, los protocolos de lavado de los capilares al comienzo y al final del día, así como entre inyecciones, fueron los que se detallan a continuación (todos los lavados se realizaron con una presión de 20 psi).

- Al comienzo del día el capilar se lavó con agua Milli-Q durante 1 minuto y con BGE durante otro minuto.
- Entre inyecciones, se hizo pasar metanol durante 1 minuto, seguidamente, agua Milli-Q durante otro minuto y, finalmente, BGE durante 1 minuto más.
- Al final del día, el capilar se lavó con metanol durante 1 minuto y posteriormente con agua Milli-Q 2 minutos más.

Procedimiento de SPE (sección IV.1): Las mejores condiciones de extracción fueron las que se describen a continuación. En primer lugar, se activó el cartucho de extracción Oasis[®] HLB con 15 mL de metanol y, seguidamente, con 10 mL de agua Milli-Q. A continuación, se pasó por dicho cartucho la muestra (agua mineral, de suministro urbano y de estanque), previamente filtrada y ajustado su pH a 3,3 con HCl 1,0 M. Seguidamente, se lavó el cartucho con 1 mL de agua Milli-Q y se secó a vacío de -10 mmHg durante 25 minutos. Los analitos retenidos se eluyeron con 2 mL de una disolución metanol:diclorometano (1:1, v/v) y, posteriormente, con 5 mL de diclorometano. Finalmente, se evaporó el disolvente orgánico hasta sequedad a 40°C y 500 mbar en un rotavapor. El residuo se disolvió en 1 mL de una disolución 1:3 (v/v) agua:tetraborato sódico 100 mM a pH 8,5.

Procedimiento de SPME (secciones IV.2 y IV.3): Tras la optimización descrita en la sección IV.2, las condiciones óptimas de extracción, utilizadas tanto en la sección IV.2 como en la IV.3, fueron las que a continuación se señalan. Inicialmente se activó la fibra de PDMS/DVB introduciéndola directamente en metanol con agitación constante a 500 rpm durante 30 minutos (entre extracciones se lavó la fibra de manera similar, pero esta vez durante 20 minutos). A continuación, se extrajo un volumen de 10 mL de muestra (extracto de tomate, vino blanco, rosado y tinto) en un vial de 16 mL, junto con 3,0 g de NaCl (30%, p/v). Seguidamente, tras ajustar el pH a 9,5 con una disolución de NaOH 1,0 M, se introdujo la fibra de PDMS/DVB directamente, de manera que la extracción se llevó a cabo a temperatura ambiente bajo agitación constante a 900 rpm durante 143 minutos. La desorción de los plaguicidas retenidos se llevó a cabo con 1,0 mL de metanol durante 13 minutos a 1000 rpm. Finalmente se evaporó el disolvente orgánico hasta sequedad a 40°C y 250 mbar en un rotavapor. El residuo se disolvió en 1 mL de una disolución 1:3 (v/v) agua:tetraborato sódico 100 mM a pH 8,5.

Tratamiento de las muestras:

- Agua mineral y de suministro urbano: Se filtraron unos 500 mL de agua con filtros de 0,22 μm (Millex-GV₁₃, Millipore). Se ajustó el pH a 3,3 con HCl 1,0 M y se aplicó el procedimiento de SPE descrito.
- Agua de estanque: Se filtraron 250 mL de agua con filtros de 0,22 μm (Millex-GV₁₃, Millipore). Se ajustó el pH a 3,3 con HCl 1,0 M y se aplicó el procedimiento de SPE descrito.
- Vinos: Se filtraron 10 mL de vino (blanco, rosado y tinto) con filtros de 0,22 μm (Millex-GV₁₃, Millipore) y se sometieron al procedimiento de SPME descrito.
- Tomate: Se tomaron 5 g de tomate homogeneizado que fueron extraídos con 5 mL de acetona bajo ultrasonidos durante 5 minutos y se centrifugó a 4000 rpm durante otros 5 minutos. Se filtró el sobrenadante con filtros de 0,22 μm (Millex-GV₁₃, Millipore) y se evaporó hasta sequedad a 45°C y 500 mbar en un rotavapor. El residuo obtenido se disolvió en 10 mL de agua Milli-Q y se aplicó el procedimiento SPME descrito.

III.5.2 Procedimientos experimentales utilizados en las determinaciones por GC

Separación cromatográfica: La separación por GC se llevó a cabo utilizando un NPD a una temperatura de 320°C. Como gas portador y también como gas auxiliar (gas de *make up*) se utilizó nitrógeno, a unos flujos de 1,0 mL/min y 30 mL/min, respectivamente. Tras la correspondiente etapa de pretratamiento, se inyectó, en modo *splitless* a 280°C, un volumen de muestra de 2,0 µL. El programa de temperatura del horno fue el siguiente: 120°C durante 3 minutos, rampa de 7°C/min hasta alcanzar los 220°C, que se mantienen durante 5 minutos y, finalmente, rampa de 5°C/min hasta alcanzar los 300°C, que se mantienen durante otros 5 minutos (tiempo total: 43 minutos).

Procedimiento de SPE (sección IV.4): Las mejores condiciones de extracción fueron las que se describen a continuación. En primer lugar, se empaquetó una columna de SPE con 40 mg de MWCNTs (que previamente se secaron en estufa a 120°C durante 2 horas y se dejaron enfriar en un desecador) y se activó con 10 mL de acetonitrilo y, seguidamente, con 10 mL de agua Milli-Q. A continuación, se pasó por dicho cartucho la muestra (zumos de frutas y aguas), previamente filtrada y ajustado su pH a 6,0 con HCl 1,0 M (muestras de agua) o con NaOH 1,0 M (muestras de zumo). Seguidamente, y sólo en el caso de las muestras de zumo, se lavó la columna con 2, 3, 6 y 6 mL de agua Milli-Q (zumos de manzana, naranja, uva y piña, respectivamente). Posteriormente, se secó a vacío de -10 mmHg durante 20 minutos. Los analitos retenidos se eluyeron con 20 mL de diclorometano que posteriormente se evaporaron en un rotavapor a 40°C y 700 mbar. El residuo se disolvió en 1 mL de una mezcla de ciclohexano y sulfato sódico anhidro, que seguidamente se filtró utilizando filtros de 0,20 µm (Chromafil® O-20/25 de teflón, PTFE).

Tratamiento de las muestras:

- Agua mineral, subterránea y de escorrentía: Se filtraron unos 800 mL de agua con filtros de 0,20 µm (Chromafil® O-20/25 de teflón, PTFE). Se ajustó el pH a 6,0 con HCl 1,0 M y se aplicó el procedimiento de SPE descrito.

- Zumos de frutas: Se diluyeron 10 mL de zumo de fruta (manzana, uva, naranja y piña) con agua Milli-Q (dilución 1:1, v/v). Se ajustó el pH a 6,0 con NaOH 1,0 M y se aplicó el procedimiento de SPE descrito.

III.5.3 Procedimientos experimentales utilizados en las determinaciones por HPLC

Separación cromatográfica: Separación en régimen gradiente utilizando 100% de agua Milli-Q como fase móvil A y 100% de acetonitrilo como fase móvil B. Tras la correspondiente etapa de pretratamiento, se inyectó un volumen de muestra de 20 μ L a un flujo de 1,0 mL/min y se aplicó el programa de gradiente de elución que se muestra en la Tabla III.5.1, según las curvas de gradiente de elución que se muestran en la Figura III.5.1.

Tabla III.5.1 Programa de gradiente de elución empleado.

Tiempo (min)	% A	% B	Tramo de la curva
0	75	25	(Isocrático)
3	75	25	6
7	45	55	3
12	40	60	7
22	0	100	5
27	0	100	6
32	75	25	6

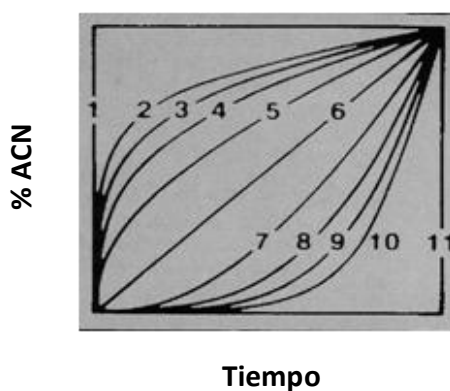


Figura III.5.1 Curvas generales de gradiente de elución utilizadas en esta investigación.

Procedimiento de DLLME (sección IV.5): Tras la optimización descrita en la sección IV.5, las condiciones óptimas de extracción fueron las que a continuación se señalan: Inicialmente se colocó un volumen de 10 mL de muestra (extracto de plátano reconstituido con 10 mL de agua Milli-Q con un 28,9%, p/v, de NaCl, a pH 2,7, ajustado con HCl 1,0 M) en un tubo de vidrio de 15 mL. Seguidamente, se añadió una disolución de 88 mg de hexafluorofosfato de 1-hexil-3-metilimidazolio ($[\text{C}_6\text{MIm}][\text{PF}_6]$) en 714 μL de metanol y se centrifugó la mezcla resultante a 4000 rpm durante 20 minutos. Posteriormente, se eliminó la fase acuosa sobrenadante con ayuda de una jeringa y la fase orgánica depositada, que contenía el líquido iónico y los analitos (20 μL), se disolvió en acetonitrilo hasta alcanzar un volumen final de 125 μL .

Tratamiento de las muestras de plátano: Se pesó 1 g de plátano previamente homogeneizado en un tubo de centrifuga de 50 mL, se añadieron 5 mL de acetonitrilo y se agitó vigorosamente durante 1 minuto con ayuda de un agitador Vortex a la máxima velocidad. Seguidamente, se adicionaron 2 g de sulfato de magnesio anhidro, 0,5 g de NaCl, 0,5 g de citrato trisódico dihidratado y 0,25 g de citrato disódico sesquihidratado y nuevamente se agitó vigorosamente. A continuación, se introdujo esta mezcla en un baño de ultrasonidos durante 5 minutos y posteriormente, se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se filtró con filtros de 0,45 μm (Chromafil[®] Xtra PET-45/25 de poliéster) y se evaporó hasta sequedad a 40°C y 205 mbar en un rotavapor. El residuo se disolvió en 10 mL de agua Milli-Q con un 28,9% (p/v) de NaCl, a pH 2,7, ajustado con HCl 1,0 M y se aplicó el procedimiento de DLLME descrito.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1 Aplicación de la cromatografía electrocinética micelar en combinación con la extracción en fase sólida y técnicas de *stacking* para la determinación de un grupo de doce plaguicidas en aguas.

Como se ha mencionado en el Capítulo I de la presente Tesis Doctoral, la preocupación pública por los residuos de plaguicidas ha aumentado notablemente durante las últimas décadas, por lo que su determinación en muestras medioambientales y agroalimentarias es de gran importancia. En la presente sección se describe la determinación analítica de un grupo de doce plaguicidas de uso frecuente en las Islas Canarias (carbendazima, pirimicarb, metalaxil, pirimetanil, procimidona, nuarimol, azoxistrobin, tebufenocida, fenarimol, benalaxil, penconazol y tetradifón) en aguas (mineral, de suministro urbano y de estanque), mediante MEKC-DAD. El método propuesto incluye un procedimiento de SPE fuera de línea y la aplicación de técnicas de preconcentración en línea (*stacking*) que permiten la determinación de este grupo de plaguicidas en aguas a niveles de ng/L, niveles por debajo de sus LMRs.

IV.1.1 Antecedentes

Como ya se ha comentado, una de las mayores limitaciones de la CE es su baja sensibilidad, aunque se ha logrado mejorar considerablemente gracias a la introducción de etapas de enriquecimiento o preconcentración de la muestra previas a la separación electroforética, tanto en línea como fuera de línea. La introducción de estas etapas también ha tenido éxito en el análisis de plaguicidas. En este caso, los métodos más utilizados para incrementar la sensibilidad de la CE son los procedimientos de preconcentración fuera de línea, como la SPE (Hernández-Borges y col., 2005b, 2005c), la SPME (Rodríguez y col., 2003; Hernández-Borges y col., 2004b; Frías-García y col., 2004) o la CPE (Carabias-Martínez y col., 1999, 2000, 2003a). Entre ellos, la SPE es el método más común para la extracción y enriquecimiento de plaguicidas de diversas matrices, especialmente de muestras de aguas, como paso previo a su análisis por CE

(Menzinger y col., 2000; Picó y col., 2003; Hernández-Borges y col., 2004a). Entre las diferentes fases estacionarias utilizadas para la extracción de plaguicidas mediante SPE, la más común es la C_{18} (Picó y col., 2003), aunque otras como el carbón activo (Carneiro y col., 2000) y las poliméricas Oasis HLB (Menzinger y col., 2000; Jiménez y col., 2001; Picó y col., 2003; Nogueira y col., 2003, 2004; Hernández-Borges y col., 2004a; Belmonte-Vega y col., 2005) y PS-DVB (Turiel y col., 2000b) también se han aplicado con éxito.

Junto a estos métodos de preconcentración fuera de línea, en los últimos años han alcanzado una gran importancia las denominadas técnicas de *stacking* como métodos de preconcentración en línea. Estas técnicas, que se basan en fenómenos electroforéticos, focalizan y preconcentran los analitos aprovechando diferencias en propiedades fisicoquímicas tales como viscosidad, conductividad, pH, fuerza iónica, etc., existentes entre la matriz de la muestra y el BGE (Britz-McKibbin y Chen, 2000). Entre los diferentes tipos de *stacking* que se han aplicado en el análisis de plaguicidas cabe destacar el *stacking* en modo normal (NSM) y el *stacking* en modo de polaridad invertida (REPSM), ambos utilizados en la presente investigación y que se describirán más adelante. El empleo del NSM y del REPSM ha permitido obtener incrementos de sensibilidad del orden de 10 y 100 veces, respectivamente (Núñez y Sentellas, 2002). Si bien el NSM es, después de la inyección electrocinética, una de las técnicas de *stacking* más comunes en el análisis de plaguicidas, todo lo contrario sucede con el REPSM (pero no por ello es menos eficaz). De hecho, son muy pocos los trabajos relacionados con la aplicación de esta técnica para la preconcentración de plaguicidas, concretamente en muestras de agua (Turiel y col., 2000a; Carabias-Martínez y col., 2003b) y vino blanco (Molina-Mayo y col., 2007).

Tal como se ha mencionado en el Capítulo I, el uso intensivo de plaguicidas puede ocasionar la contaminación de aguas superficiales y subterráneas, repercutiendo negativamente sobre el medio ambiente y el ser humano. Ello genera la necesidad de desarrollar metodologías analíticas que permitan determinar el contenido de plaguicidas en aguas a niveles de trazas con un grado de fiabilidad aceptable. Si bien la CE se ha aplicado al análisis de plaguicidas en

aguas en diversas ocasiones (Picó y col., 2003; Hernández-Borges y col., 2004a), no es muy frecuente encontrar un método de CE que permita determinar simultáneamente un número elevado de plaguicidas a niveles de los LMRs establecidos por la legislación vigente (Karcher y El Rassi, 1999; Tegeler y El Rassi, 2001; Hernández-Borges y col., 2004a). Teniendo en cuenta este hecho, para el presente trabajo se seleccionó un grupo de doce plaguicidas de uso frecuente en las Islas Canarias, pertenecientes a diversas familias, concretamente a los benzimidazoles (carbendazima), carbamatos (pirimicarb), acilalaninas (metalaxil y benalaxil), anilino pirimidinas (pirimetanil), dicarboximidias (procimidona), pirimidinas (nuarimol y fenarimol), metoxiacrilatos (azoxistrobin), diacilhidrazina (tebufenocida), triazoles (penconazol) y organosulfurados (tetradifón) (*The e-pesticide manual*, 2001). En la Figura IV.1.1 se muestran sus estructuras químicas. Estos doce plaguicidas no se habían separado y determinado simultáneamente en ningún trabajo anterior, como se pudo comprobar al realizar una revisión bibliográfica exhaustiva al comienzo de este estudio. De hecho, de los plaguicidas mencionados, el grupo más numeroso que se había determinado simultáneamente por CE estaba constituido por pirimetanil, pirimicarb y procimidona, determinaciones que se llevaron a cabo en frutas (Juan-García y col., 2005a) y en vino blanco (Molina-Mayo y col., 2007).

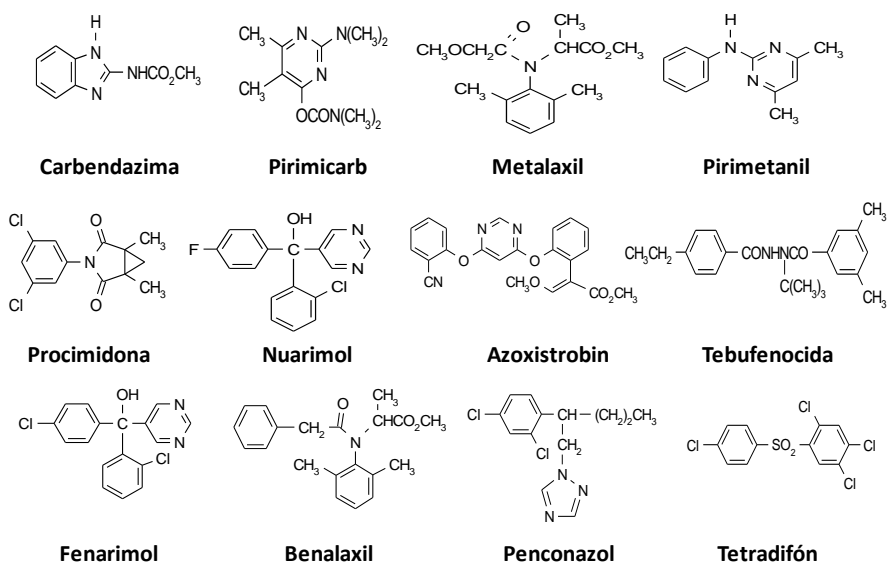


Figura IV.1.1 Estructuras químicas de los doce plaguicidas estudiados.

IV.1.2 Separación electroforética

Los plaguicidas que se han seleccionado en el presente estudio se utilizan habitualmente en las Islas Canarias, especialmente en la actividad vitícola, que constituye una parte importante de la producción agrícola canaria, como se indicó en la sección I.1.6. La Tabla IV.1.1 muestra algunas de las características y aplicaciones de los doce plaguicidas de estudio. Como puede observarse, no todos estos compuestos son ionizables en disolución acuosa, por lo que su separación simultánea no es viable por CZE. Todo lo contrario sucede con la MEKC, que permite separar tanto analitos neutros como cargados, por lo que la separación por esta técnica se plantea, en principio, como factible.

Para llevar a cabo una separación por MEKC, normalmente se utiliza un BGE de pH elevado que contiene una sustancia tensioactiva a una concentración superior a su CMC, de modo que estará formado por micelas de relativa hidrofobicidad. Estas micelas son estructuras dinámicas, ya que se comportan, en términos cromatográficos, como fases pseudoestacionarias que se desplazan a lo largo de la columna. Así, cuando un analito neutro es inyectado en una disolución micelar, se produce una distribución del mismo entre la micela y el resto de la disolución (interacciones hidrófobas), en función de su coeficiente de partición específico. Si el analito está cargado eléctricamente, las interacciones serán de tipo hidrófobo e iónico (Figura IV.1.2).

La selectividad de una separación por MEKC puede ser modificada por utilización de tensioactivos de diversa naturaleza (aniónica, neutra, catiónica o zwitteriónica) que condicionan la migración de las micelas hacia el cátodo o el ánodo. Los tensioactivos más utilizados son los aniónicos, especialmente el SDS debido a su baja CMC, alta solubilidad en agua, pequeña absorción molar en el UV (incluso a bajas longitudes de onda), bajo coste y disponibilidad. Este tensioactivo, cuya CMC es 8,1 mM a 25°C (Khaledi, 1998) ha sido el utilizado en la presente investigación.

Tabla IV.1.1.1. Características y aplicaciones de los plaguicidas estudiados (*The e-pesticide manual*, 2001).

Plaguicida	Mw (g/mol)	pK _a	log K _{ow}	LMR (mg/kg)	Actividad	Ámbito de aplicación
Carbendazima	191,2	4,20	1,38-1,49	0,1-5	Fungicida	Frutas, vegetales y cereales
Pirimicarb	238,3	4,44	1,70	0,05-0,5	Insecticida	Frutas, vegetales, cereales y flores
Metalaxil	279,3	<<0	1,75	0,05-10	Fungicida	Frutas y vegetales
Pirimetanil	199,3	3,52	2,84	0,02-5	Fungicida	Frutas, vegetales y flores
Procimidona	284,1	-	3,14	0,02-10	Fungicida	Frutas y vegetales
Nuarimol	314,7	-	3,18	0,01-2	Fungicida	Frutas, vegetales y cereales
Azoxistrobin	403,4	-	2,50	0,05-20	Fungicida	Frutas, vegetales y cereales
Tebufenocida	352,5	-	4,25	0,02-2	Insecticida	Frutas, vegetales, cereales y flores
Fenarimol	331,2	-	3,69	0,02-5	Fungicida	Frutas, vegetales, cereales y flores
Benalaxil	325,4	-	3,54	0,05-2	Fungicida	Frutas y vegetales
Penconazol	284,2	1,51	3,72	0,05-0,5	Fungicida	Frutas, vegetales y flores
Tetradifón	356,0	-	4,61	0,02-3	Acaricida	Frutas, vegetales y flores

Mw: Peso molecular; K_{ow}: Coeficiente de partición octanol-agua; LMR: Según datos del MAPA en el momento de la realización de este estudio (2007).

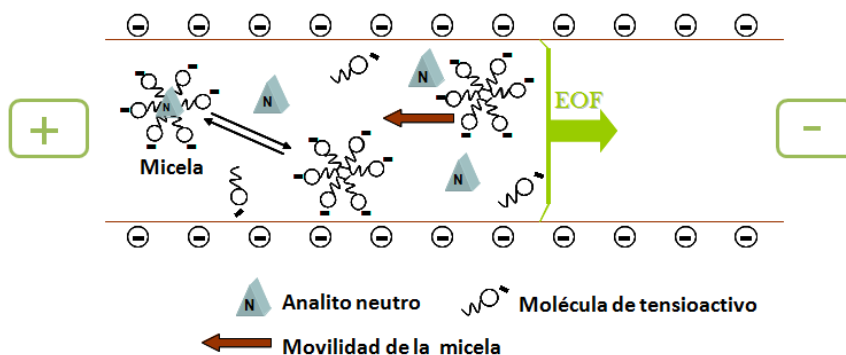


Figura IV.1.2 Esquema de la separación por MEKC utilizando un tensioactivo aniónico.

Otro factor que permite variar la selectividad de la separación por MEKC es el uso de aditivos tales como ciclodextrinas, sales, disolventes orgánicos, etc., ya que modifican las constantes de distribución de los analitos entre las fases micelar y acuosa, permitiendo obtener también una mayor resolución de los picos. En este estudio se utilizaron diferentes modificadores orgánicos, concretamente acetonitrilo, 1-propanol y 2-propanol.

Con objeto de obtener las mejores condiciones para la separación de los doce plaguicidas por MEKC-DAD se estudiaron diversos factores que modifican el EOF y, por tanto, la movilidad de dichos analitos, como son la composición, concentración, adición de modificadores orgánicos y pH del BGE, así como la temperatura de trabajo y voltaje aplicado. Antes de evaluar la influencia de estos factores en la separación, se realizaron unos estudios preliminares para seleccionar la longitud de onda de trabajo y la longitud del capilar. Una revisión bibliográfica mostró que prácticamente todos los plaguicidas estudiados absorbían radiación de longitudes de onda comprendidas entre 210 y 240 nm. Teniendo en cuenta este dato y a partir de los correspondientes espectros de absorción realizados, se pudo comprobar que las absorciones más altas tenían lugar a 210 nm, excepto en el caso del pirimicarb, cuyo máximo de absorción se sitúa a 240 nm. Se seleccionaron, pues, estas dos longitudes de onda para la posterior determinación de los doce plaguicidas. En lo que respecta a la longitud del capilar, se utilizó un capilar de 50 cm de longitud efectiva (57 cm de longitud total) y 50 μm de diámetro interno, dimensiones que son bastante habituales en CE para obtener buenas eficacias,

resoluciones adecuadas y tiempos de análisis relativamente cortos (van Biesen y Bottaro, 2006).

Inicialmente se llevaron a cabo diversos experimentos con objeto de seleccionar la composición más adecuada del BGE. Para ello, se prepararon BGEs constituidos por fosfato o tetraborato sódicos a concentraciones entre 50 y 100 mM y 30 mM en SDS, a pH 8,5. En todos los casos la muestra, constituida por unos 5 mg/L de todos los analitos, se disolvió en el propio BGE y se inyectó durante 8 segundos a 0,5 psi. En la Figura IV.1.3 se presentan los electroferogramas correspondientes a la separación de los doce plaguicidas por MEKC-DAD bajo alguna de las condiciones estudiadas en estos ensayos iniciales: fosfato sódico 100 mM y SDS 30 mM a pH 8,5 (Figura IV.1.3A) y tetraborato sódico 100 mM y SDS 30 mM a pH 8,5 (Figura IV.1.3B).

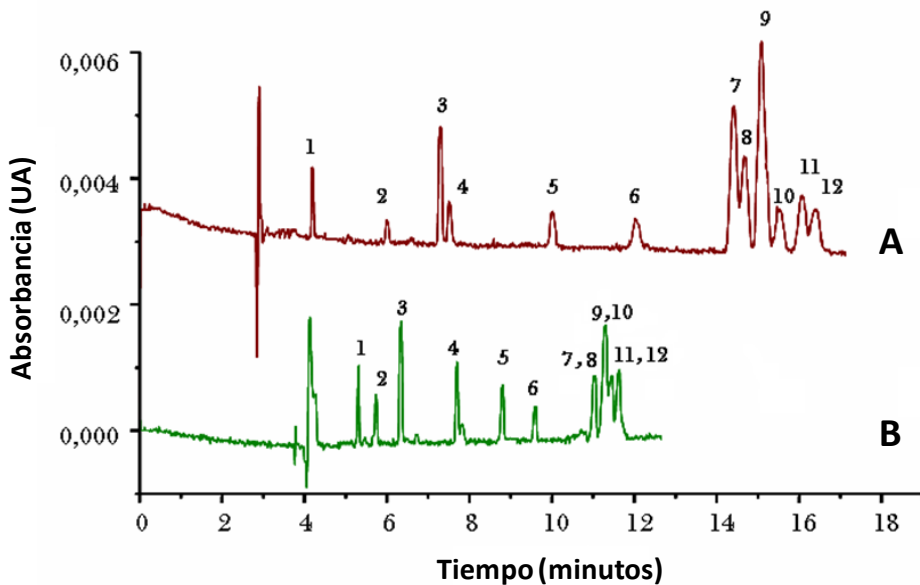


Figura IV.1.3 Influencia de la composición del BGE en la separación de los doce plaguicidas. Temperatura: 25°C. Voltaje aplicado: +22 kV. Detección: 210 nm. Inyección hidrodinámica durante 8 segundos a 0,5 psi. BGE: fosfato sódico 100 mM y SDS 30 mM a pH 8,5 (A) y tetraborato sódico 100 mM y SDS 30 mM a pH 8,5 (B). Muestra: 5 mg/L de cada plaguicida, excepto cabendazima, pirimicarb, metalaxil (10 mg/L) y fenarimol (2,5 mg/L), en fosfato sódico 100 mM y SDS 30 mM a pH 8,5 (A) y en tetraborato sódico 100 mM y SDS 30 mM a pH 8,5 (B). (1) Carbendazima, (2) pirimicab, (3) metalaxil, (4) pirimetanil, (5) procimidona, (6) nuarimol, (7) azoxistrobin, (8) tebufenocida, (9) fenarimol, (10) benalaxil, (11) penconazol y (12) tetradifón.

Como puede observarse, a pesar de que el BGE constituido por fosfato sódico da lugar a una mejor resolución de los picos, el uso de tetraborato sódico proporciona mejores resultados en términos de eficacia y tiempos de análisis, de ahí que se utilizara para los siguientes ensayos.

Teniendo en cuenta que el pH del BGE es un parámetro fundamental a considerar en las separaciones por CE (ya que modifica el EOF y, por tanto, las movilidades de los analitos a través del capilar), el siguiente paso fue seleccionar el pH más adecuado para la separación de los doce analitos. Con este objetivo se llevaron a cabo diversos ensayos a distintos valores de pH (ajustado con NaOH 0,1 M) manteniendo constante las concentraciones de tetraborato sódico y SDS (100 mM y 30 mM, respectivamente). Estos ensayos se realizaron en el rango de pH de 7 a 9, ya que estos valores proporcionan EOFs altos y, por tanto, separaciones rápidas. Además, a valores inferiores de pH (sobre todo por debajo de 4,4) la protonación de algunos plaguicidas (concretamente, carbendazima, pirimicarb, pirimetanil y penconazol), dificulta la separación simultánea de los doce compuestos por MEKC-DAD con SDS como tensioactivo, mientras que valores muy elevados de pH podrían originar la descomposición de algunos de ellos (*The e-pesticide manual*, 2001). Los mejores resultados se obtuvieron al utilizar un pH de 8,5, valores inferiores de pH proporcionaron tiempos de análisis altos, mientras que valores superiores provocaban una pérdida importante de resolución.

A continuación, se estudió la influencia de la concentración del BGE, con el fin de obtener el medio más adecuado para la separación de todos los analitos en el menor tiempo posible, con una buena eficacia y resolución de los picos. En este sentido, se prepararon BGEs constituidos por tetraborato sódico a concentraciones comprendidas entre 10 y 100 mM, con concentraciones de SDS en el intervalo 15-30 mM, a pH 8,5. Entre los más de 20 BGEs estudiados, los mejores resultados se obtuvieron al utilizar un BGE constituido por tetraborato sódico 100 mM, SDS 30 mM y pH 8,5, aunque no permitió alcanzar una resolución total de los analitos. Este hecho hizo necesaria la adición de un modificador orgánico, con el fin de producir cambios en la viscosidad y en las constantes de reparto analito-micela, de cara a obtener variaciones en la movilidad de los analitos en el medio de separación. Los

modificadores orgánicos que se utilizaron fueron acetonitrilo, 1-propanol y 2-propanol a concentraciones entre 0 y 10% v/v (en intervalos de 2%), puesto que por encima de este valor se rompe la estructura micelar (Khaledi, 1998). En general, se observó que la utilización de modificadores orgánicos producía un aumento en los tiempos de análisis, debido al incremento de viscosidad del BGE. Entre los tres modificadores orgánicos ensayados, fue el 1-propanol el que proporcionó las mejores separaciones. La Figura IV.1.4 muestra la influencia de la concentración de este modificador orgánico en la separación de los doce plaguicidas. Como puede observarse, el BGE que proporcionó los mejores resultados en términos de resolución y velocidad de análisis fue el constituido por tetraborato sódico 100 mM con SDS 30 mM a pH 8,5 y con un 6% (v/v) de 1-propanol.

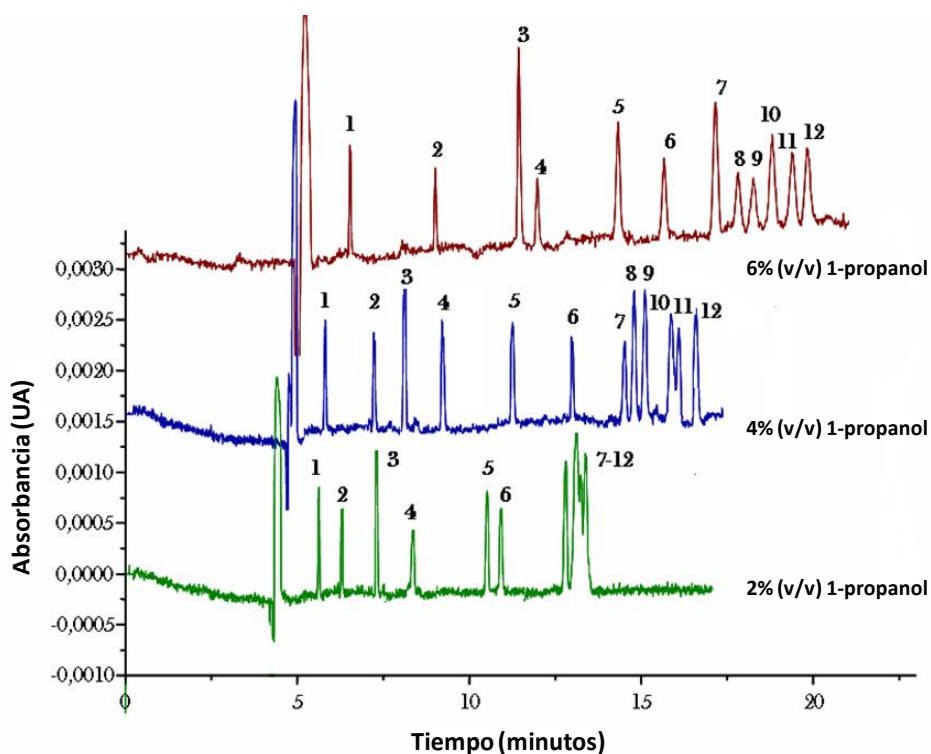


Figura IV.1.4 Influencia de la concentración de 1-propanol en la separación de los doce plaguicidas. BGE: tetraborato sódico 100 mM y SDS 30 mM a pH 8,5 con 1-propanol al 6%, 4% y 2% (v/v). Muestra disuelta en tetraborato sódico 100 mM y SDS 30 mM a pH 8,5. Identificación y restantes condiciones experimentales: ver Figura IV.1.3.

Otros aspectos que se tuvieron en cuenta a la hora de seleccionar las mejores condiciones de separación fueron la temperatura de trabajo y el voltaje aplicado, ya que estos factores influyen directamente en la movilidad del EOF. Tras realizar diversos ensayos a temperaturas comprendidas entre 20 y 30°C y potenciales entre +18 y +22 kV, se observó que la obtención de menores tiempos de análisis, altas resoluciones y buenas eficacias se correspondía con una temperatura de 25°C y un voltaje de +22 kV.

La Figura IV.1.5 muestra la separación por MEKC-DAD de los doce plaguicidas en las mejores condiciones de separación. Se puede observar que el tiempo de análisis fue inferior a 20 minutos y las eficacias de pico fueron de hasta 350.000 platos teóricos por metro. Sin embargo, la sensibilidad obtenida (LODs comprendidos entre 0,793 y 4,01 mg/L) no fue demasiado elevada. Por tanto, se hizo necesaria la aplicación de técnicas de preconcentración, en particular las técnicas de *stacking*, con el fin de mejorar la sensibilidad del método.

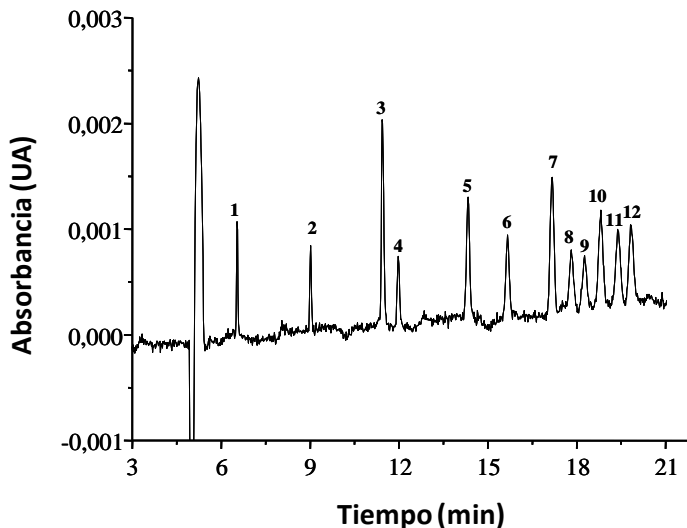


Figura IV.1.5 Electroferograma de la separación de los doce plaguicidas por MEKC-DAD bajo las mejores condiciones de separación. BGE: tetraborato sódico 100 mM y SDS 30 mM a pH 8,5 y 6% (v/v) 1-propanol. Muestra disuelta en tetraborato sódico 100 mM y SDS 30 mM a pH 8,5. Identificación y restantes condiciones experimentales: ver Figura IV.1.3.

Entre las diversas técnicas de *stacking* que existen, en la presente investigación se aplicaron el NSM y el REPSM, que se describen brevemente a continuación. En estas técnicas de preconcentración es importante optimizar tanto el tiempo de inyección como la conductividad de la muestra, ya que de ambos parámetros depende la sensibilidad que se pueda obtener. De hecho, tiempos de inyección demasiado elevados pueden originar una disminución en la eficacia y resolución de los picos con la consiguiente pérdida de sensibilidad y, además, tiempos de análisis elevados. La conductividad de la muestra, por su parte, influirá directamente en el campo eléctrico creado en dicha zona y, por tanto, en la velocidad electroforética de los analitos. En general, cuanto más rápidamente se muevan los analitos hacia la frontera entre la muestra y el BGE, mayor será la preconcentración que se alcance.

Stacking en modo normal (NSM)

En NSM, la preconcentración de los analitos tiene lugar como consecuencia de una diferencia de conductividad y, consecuentemente, de las velocidades electroforéticas de los analitos, entre la muestra y el BGE. La muestra, de baja conductividad, se inyecta hidrodinámicamente en un capilar que contiene BGE de composición similar pero de conductividad mayor. Al aplicar una diferencia de potencial entre los extremos del capilar de separación, el campo eléctrico en la zona de la muestra será mayor respecto de la zona del BGE, ya que de acuerdo con la ley de Ohm, la diferencia de potencial es inversamente proporcional a la conductividad. Como consecuencia, los analitos experimentan un mayor campo eléctrico y se mueven con una velocidad electroforética elevada hasta llegar a la frontera entre ambas zonas, donde su velocidad electroforética disminuye y se produce la preconcentración. Este modo de *stacking* se puede aplicar para la preconcentración de cationes y aniones (no simultáneamente) trabajando, en el primer caso, en polaridad normal y, en el segundo, en polaridad inversa. Como disolvente de la muestra generalmente se utiliza agua o una disolución de concentración inferior a la del BGE, aunque en algunos casos se emplean disolventes orgánicos (generalmente acetonitrilo), dado que posee una resistividad

adecuada para favorecer el *stacking*. En este último caso, la técnica se denomina *stacking* con acetonitrilo (Chang y Wang, 2004).

Un caso particular del NSM se verifica cuando en el medio, además de los analitos, existen micelas. Se trata, por tanto, de una separación por MEKC en la que el NSM se aplica con los mismos principios que en ausencia de micelas. La Figura IV.1.6 muestra un esquema de la aplicación de esta técnica en una separación de analitos neutros utilizando micelas aniónicas. Al igual que en el caso anterior en ausencia de micelas, inicialmente se inyecta hidrodinámicamente la muestra disuelta en un electrolito de baja conductividad. En general, dicha muestra carece de micelas o bien las contiene a muy baja concentración, de manera que una vez que entra en contacto con el BGE, de conductividad mayor y constituido por micelas aniónicas, se producirá una distribución de los analitos entre dichas micelas (que penetran en la región de la muestra) y el resto de la disolución en función de sus coeficientes de partición específicos. Al aplicar una diferencia de potencial entre los extremos del capilar de separación, se produce una migración de los analitos unidos a las micelas hacia la frontera entre la zona de la muestra y del BGE, que en este caso se corresponde con el ánodo, puesto que las micelas son aniónicas. Finalmente, los analitos se separan en función de sus movilidades electroforéticas efectivas y de sus distintas constantes de asociación analito-micela. Mediante esta técnica, se consigue un aumento de sensibilidad y selectividad de la separación como consecuencia de las interacciones específicas entre analitos y micelas.

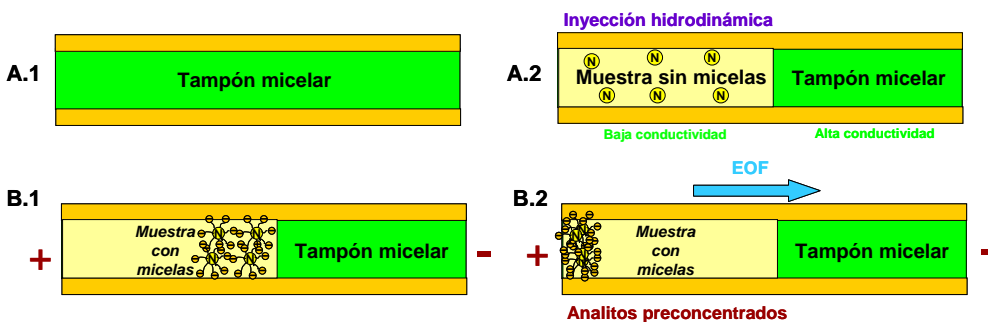


Figura IV.1.6 Esquema del NSM aplicado en MEKC para la separación de compuestos neutros utilizando micelas aniónicas.

Con objeto de aplicar estos procedimientos para la preconcentración de los doce plaguicidas, se prepararon disoluciones de los analitos diez veces más diluidas que en el caso de la separación sin *stacking*, disolviendo la muestra en acetonitrilo puro, en disoluciones 3:1, 1:1 y 1:3 (v/v) agua:tetraborato sódico 100 mM y SDS 30 mM a pH 8,5, así como en disoluciones 3:1, 1:1 y 1:3 (v/v) agua:tetraborato sódico 100 mM a pH 8,5 (BGE sin micelas). También se realizaron experiencias con los plaguicidas disueltos únicamente en agua, en tetraborato sódico 100 mM y SDS 30 mM a pH 8,5 y en tetraborato sódico 100 mM a pH 8,5. En todos estos casos se aplicó el método NSM-MEKC-DAD, inyectando hidrodinámicamente la muestra (0,5 psi) a distintos tiempos, comprendidos entre 30 y 70 s. La Figura IV.1.7 muestra, a modo de comparación, los resultados obtenidos tras aplicar el procedimiento NSM con la muestra disuelta en tetraborato sódico 100 mM a pH 8,5 (condiciones óptimas, Figura IV.1.7B) y en 3:1 (v/v) agua:tetraborato sódico 100 mM y SDS 30 mM a pH 8,5 (condiciones no óptimas, Figura IV.1.7A). En ambos casos se inyectó la muestra hidrodinámicamente durante 45 s a 0,5 psi.

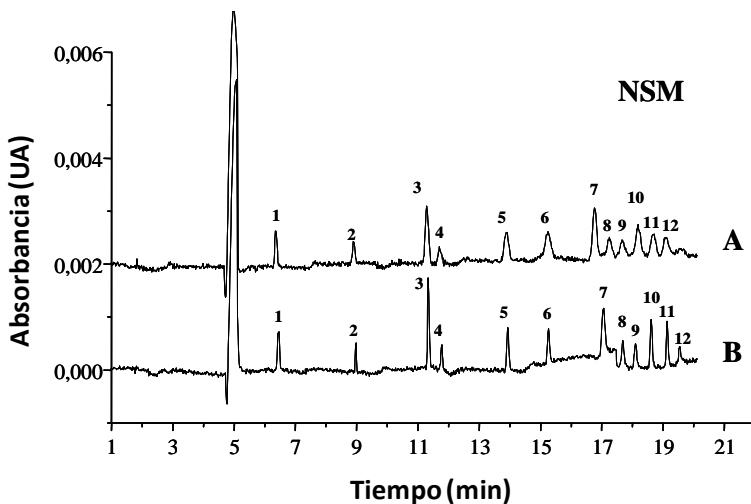


Figura IV.1.7 Electroferogramas de la separación de los doce plaguicidas por NSM-MEKC-DAD, mostrando el efecto del disolvente empleado para disolver la muestra. Inyección hidrodinámica durante 45 segundos a 0,5 psi. BGE: tetraborato sódico 100 mM y SDS 30 mM a pH 8,5 y 6% (v/v) 1-propanol. Muestra: 0,5 mg/L de cada plaguicida, excepto carbendazima, pirimicarb, metalaxil (1,0 mg/L) y fenarimol (0,25 mg/L): en (A) 3:1 (v/v) agua:tetraborato sódico 100 mM y SDS 30 mM a pH 8,5, y en (B) tetraborato sódico 100 mM a pH 8,5. Identificación y restantes condiciones experimentales: ver Figura IV.1.3.

Como puede apreciarse, la eficacia y la sensibilidad fueron mayores al disolver la muestra en tetraborato sódico 100 mM a pH 8,5 (Figura IV.1.7B). De hecho, los LODs correspondientes a la Figura IV.1.7A estuvieron comprendidos entre 113 y 554 $\mu\text{g/L}$, mientras que los relativos a la Figura IV.1.7B, lo fueron entre 78 y 459 $\mu\text{g/L}$. Esto supone una mejora de sensibilidad de hasta 15 veces con respecto a una inyección sin *stacking*. Con objeto de intentar mejorar estos resultados se aplicó el REPSM, que se describe a continuación.

Stacking en modo de polaridad invertida (REPSM)

A pesar de que inyectar un volumen elevado de muestra en el capilar origina una mayor preconcentración de los analitos, este parámetro no se debe aumentar indiscriminadamente, ya que el ensanchamiento de la banda concentrada de analitos y la disminución de la longitud efectiva de separación pueden provocar pérdidas de resolución y eficacia (García-Ruiz y Marina, 2005). Una forma de incrementar el volumen de muestra inyectado y mantener prácticamente inalterada la eficacia, consiste en eliminar la matriz de la muestra durante el proceso de *stacking*. Este procedimiento supone una variación del NSM y se denomina *stacking* con eliminación de matriz (SWMR), si los analitos no se encuentran ligados a micelas (Quirino y Terabe, 2000; Simpson y col., 2008) y *stacking* en modo de polaridad invertida (REPSM) en caso contrario (Turiel y col., 2000a). El REPSM, por tanto, implica la aplicación de la MEKC a la separación de los analitos y permite aumentar la selectividad de la separación electroforética debido, no sólo a las interacciones específicas entre los analitos y las micelas sino, también, a la eliminación de compuestos interferentes en la propia matriz.

En la Figura IV.1.8 se presenta un esquema de la aplicación del REPSM en una separación de analitos neutros mediante MEKC, utilizando micelas aniónicas. En este caso, inicialmente se inyecta hidrodinámicamente la muestra disuelta en un electrolito de baja conductividad (por lo general, sin micelas). Seguidamente se invierte la polaridad, de manera que las micelas y los analitos (repartidos entre las fases acuosa y micelar) se preconcentran en la frontera entre la muestra y el BGE, al mismo tiempo que se elimina la matriz de la muestra, al ser arrastrada por el

EOF que se desplaza en sentido catódico. Finalmente, cuando la intensidad de corriente es de un 95-97% de la del BGE, la mayor parte de la matriz de la muestra (compuestos catiónicos y neutros) es eliminada (Albin y col., 1993). En este momento, se invierte de nuevo la polaridad, de manera que los analitos se separan en función de sus movilidades electroforéticas efectivas.

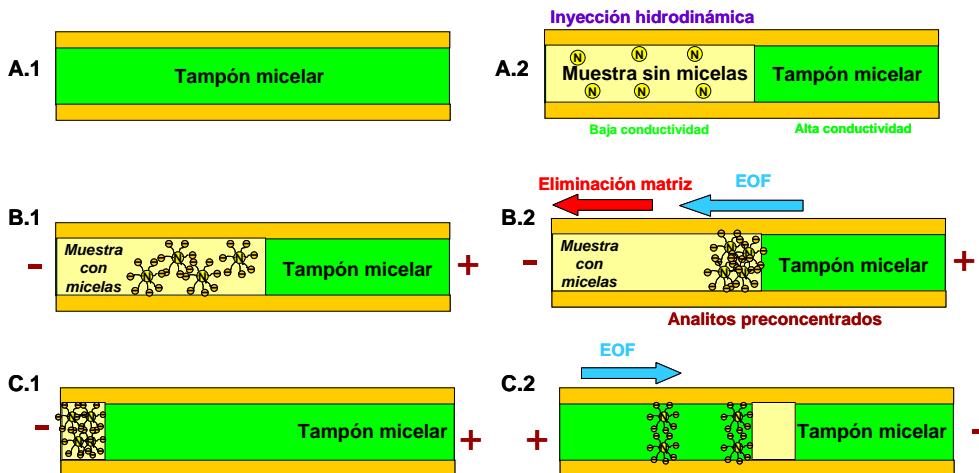


Figura IV.1.8 Esquema del REPSM aplicado en MEKC para la separación de compuestos neutros utilizando micelas aniónicas.

Con la finalidad de aplicar este procedimiento para la preconcentración de los doce plaguicidas de estudio, se prepararon disoluciones de los analitos también diez veces más diluidas que en el caso de la separación sin *stacking*. En este caso también se disolvió la muestra en disoluciones 3:1, 1:1 y 1:3 (v/v) agua:tetraborato sódico 100 mM y SDS 30 mM a pH 8,5, así como en disoluciones 3:1, 1:1 y 1:3 (v/v) agua:tetraborato sódico 100 mM a pH 8,5. También se realizaron experiencias con los plaguicidas disueltos únicamente en agua, en tetraborato sódico 100 mM y SDS 30 mM a pH 8,5 y en tetraborato sódico 100 mM a pH 8,5. En todos estos casos se aplicó el método REPSM-MEKC-DAD, inyectando la muestra a distintos tiempos, comprendidos entre 6 y 13 s. De todas las disoluciones estudiadas, los mejores resultados se obtuvieron al utilizar 1:3 (v/v) agua:tetraborato sódico 100 mM a pH 8,5 (Figura IV.1.9A), inyectando la muestra durante 11 segundos a 20 psi. En la Figura IV.1.9 se muestra una comparación entre los electroferogramas obtenidos al

aplicar el método REPSM-MEKC-DAD a los plaguicidas disueltos en disoluciones (A) 1:3, (B) 1:1 y (C) 3:1 (v/v) agua:tetraborato sódico 100 mM a pH 8,5. Además, la Figura IV.1.9D muestra el electroferograma obtenido cuando los plaguicidas se disolvieron en agua Milli-Q. Puede observarse que el uso de sólo agua en la disolución de la muestra no permite una adecuada preconcentración los analitos. Esta observación constituye un resultado importante a considerar en el posterior análisis de estos plaguicidas en muestras acuosas.

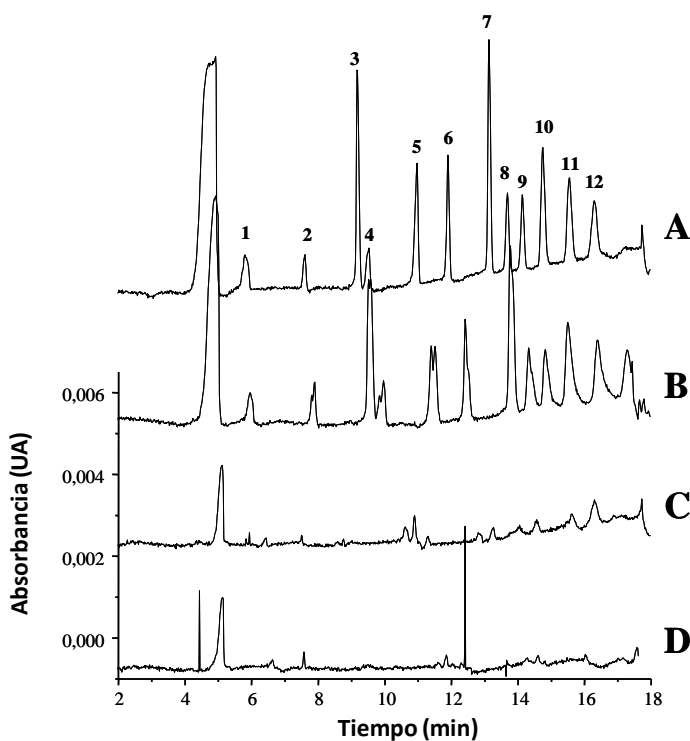


Figura IV.1.9 Electroferogramas de la separación de los doce plaguicidas por REPSM-MEKC-DAD, mostrando el efecto de la disolución empleada para disolver la muestra. Inyección hidrodinámica durante 11 segundos a 20 psi. Muestra disuelta en (A) 1:3, (B) 1:1 y (C) 3:1 (v/v) agua:tetraborato sódico 100 mM a pH 8,5 y en (D) agua Milli-Q. Identificación y restantes condiciones experimentales: ver Figura IV.1.7.

Los LODs obtenidos bajo las mejores condiciones del REPSM estuvieron comprendidos entre 33,6 $\mu\text{g/L}$ para el azoxistrobin y 216 $\mu\text{g/L}$ para la carbendazima, lo que supuso un aumento de sensibilidad respecto del NSM de hasta 11 veces. Además, es de destacar que el uso del REPSM redujo ligeramente

los tiempos de análisis, permitiendo la separación de los doce plaguicidas en 17 minutos (los tiempos de análisis obtenidos al aplicar el NSM y la MEKC sin *stacking* fueron de unos 20 minutos). Este resultado se debe principalmente a la eliminación de la matriz en el capilar. La Tabla IV.1.2 muestra un estudio comparativo de los LODs obtenidos al aplicar el método MEKC-DAD sin *stacking*, utilizando el NSM y el REPSM. Como se puede observar, tanto el NSM como el REPSM proporcionaron incrementos de sensibilidad respecto de las condiciones sin *stacking*, aunque en el caso del REPSM, estos incrementos de sensibilidad fueron muy superiores (de hasta 105 veces con respecto a las condiciones sin *stacking*).

Tabla IV.1.2 Comparación entre el NSM, el REPSM y las condiciones sin *stacking* en términos de sensibilidad.

Plaguicida	Sin <i>stacking</i> (8 s a 0,5 psi)	NSM (45 s a 0,5 psi)		REPSM (11 s a 20 psi)	
	LOD ($\mu\text{g/L}$) ^a	LOD ($\mu\text{g/L}$) ^a	Incremento ^b	LOD ($\mu\text{g/L}$) ^a	Incremento ^b
Carbendazima	1442	319	5	216	7
Pirimicarb	1106	194	6	117	9
Metalaxil	793	78,0	10	42,5	19
Pirimetanil	2836	191	15	84,7	33
Procimidona	1966	184	11	60,6	32
Nuarimol	2400	172	14	38,1	63
Azoxistrobin	1875	191	10	33,6	56
Tebufenozida	3027	297	10	39,7	76
Fenarimol	4005	412	10	38,0	105
Benalaxil	2913	247	12	44,3	66
Penconazol	3075	257	12	49,3	62
Tetradifón	1929	459	4	63,7	30

^a Calculado como tres veces la relación señal/ruido. ^b Incremento de sensibilidad (número de veces) obtenido respecto a las condiciones sin *stacking*.

IV.1.3 Validación del método

Una vez obtenidas las mejores condiciones de separación se llevaron a cabo los correspondientes estudios de repetibilidad del método. Con ese fin se realizaron cuatro inyecciones consecutivas a tres niveles de concentración distintos (0,50, 0,75 y 1,0 mg/L) en el mismo día (n=4) y en tres días diferentes (n=12). La

Tabla IV.1.3 muestra los valores de la desviación estándar relativa (RSD) para los tiempos de migración y áreas de pico para una concentración de 0,75 mg/L (los resultados correspondientes a los otros dos niveles de concentración fueron muy similares). En lo que respecta a la precisión en un mismo día, se observa que los porcentajes de la RSD fueron inferiores al 0,92% para los tiempos de migración y al 6,7% para las áreas de pico. En cuanto a la precisión entre días, estos estudios muestran porcentajes de RSD por debajo del 1,9% y del 8,6% para los tiempos de migración y áreas de pico, respectivamente. Estos resultados indican, por tanto, que el método desarrollado es repetible en las condiciones señaladas.

Una vez realizados los estudios de repetibilidad del método, se obtuvieron las correspondientes rectas de calibrado (basadas en las áreas de pico), inyectando cinco niveles de concentración (intervalo entre 0,25 y 1,75 mg/L) por triplicado. Como puede observarse en la Tabla IV.1.3, se obtuvo una buena linealidad para cada uno de los plaguicidas de estudio, con coeficientes de correlación (R) aceptables, superiores a 0,993.

IV.1.4 Procedimiento de SPE de aguas

Teniendo en cuenta que este grupo de plaguicidas puede contaminar las aguas, se aplicó la metodología estudiada (REPSM-MEKC-DAD) al análisis de este tipo de muestras, concretamente muestras de agua mineral, de suministro urbano y de estanque, por tratarse de tres tipos de muestras acuosas representativas. Para ello, fue necesario desarrollar un método de extracción y preconcentración de los doce plaguicidas previo a la determinación electroforética. En particular, se seleccionó la SPE, cuya optimización se describe a continuación.

Fruto de la revisión bibliográfica se pudo comprobar que no existía ningún método de SPE que fuera capaz de extraer simultáneamente estos doce analitos de tales matrices, por lo cual se hizo necesario el desarrollo de una nueva metodología para su extracción por SPE. Con esta intención, se realizaron diferentes ensayos iniciales empleando cartuchos Oasis[®] HLB, ya que su uso para la extracción de otros grupos de plaguicidas en aguas había dado buenos resultados en diversas ocasiones

Tabla IV.1.3 Datos de validación del método de determinación de los doce plaguicidas por REPSM-MEK(C-DAD).

Plaguicida	Precisión en un mismo día ^{a)} (n=4)		Precisión entre días ^{a)} (n=12)		Rango de concentración estudiado (mg/L)	b (S _b)	a (S _a)	R	S _{y/x}	LOD ^{b)} (µg/L)
	t _m (RSD %)	Área (RSD %)	t _m (RSD %)	Área (RSD %)						
Carbendazima	0,92	2,4	1,2	5,7	0,500-1,50	0,212 (0,007)	0,042 (0,007)	0,999	0,005	216
Pirimicarb	0,53	2,9	1,6	7,3	0,500-1,25	0,560 (0,046)	0,083 (0,042)	0,993	0,025	117
Metalaxil	0,44	5,6	1,7	8,5	0,275-1,10	0,707 (0,027)	0,027 (0,039)	0,994	0,013	42,5
Pirimetanil	0,58	4,6	1,6	6,3	0,500-1,25	0,264 (0,016)	0,078 (0,014)	0,996	0,009	84,7
Procimidona	0,68	3,3	1,6	8,2	0,325-1,30	0,789 (0,056)	-0,018 (0,050)	0,995	0,041	60,6
Nuarimol	0,66	2,9	1,7	7,6	0,250-1,25	0,693 (0,039)	-0,001 (0,033)	0,995	0,031	38,1
Azoxistrobin	0,62	2,7	1,9	7,6	0,325-1,63	1,12 (0,032)	-0,030 (0,035)	0,999	0,033	33,6
Tebufenocida	0,70	6,6	1,6	8,2	0,225-1,13	0,916 (0,024)	-0,019 (0,018)	0,999	0,017	39,7
Fenarimol	0,70	2,5	1,6	7,4	0,275-1,38	1,05 (0,034)	-0,035 (0,028)	0,998	0,027	38,0
Benalaxil	0,68	4,3	1,6	6,1	0,350-1,75	0,972 (0,030)	-0,047 (0,017)	0,999	0,025	44,3
Penconazol	0,70	3,1	1,5	6,7	0,350-1,75	0,964 (0,036)	-0,046 (0,042)	0,999	0,030	49,3
Tetradifón	0,80	6,7	1,6	8,6	0,225-1,13	0,566 (0,046)	-0,037 (0,042)	0,998	0,015	63,7

^{a)} Resultados obtenidos a una concentración de 0,75 mg/L. ^{b)} Calculado como tres veces la relación señal/ruido. b: Pendiente; S_y: Desviación estándar de la pendiente; a: Ordenada en el origen; S_a: Desviación estándar de la ordenada en el origen; R: Coeficiente de correlación (n=5). S_{y/x}: Error estándar de la estimación.

(Belmonte-Vega y col., 2005; Liu y col., 2006; Molina-Mayo y col., 2007). En estos experimentos iniciales se utilizó un procedimiento de SPE desarrollado previamente por nuestro grupo de investigación para la preconcentración de un grupo de cinco plaguicidas (cuatro de ellos utilizados en el presente estudio: pirimicarb, pirimetanil, procimidona y nuarimol) en agua Milli-Q (Molina-Mayo y col., 2007). Las condiciones de la SPE aplicadas fueron las que se detallan a continuación.

Los cartuchos Oasis[®] HLB se activaron con 15 mL de metanol y 10 mL de agua Milli-Q. Seguidamente, se pasaron 25 mL de agua Milli-Q enriquecida con los doce analitos a pH 3,3 (ajustado con HCl 1,0 M) y se secó el cartucho a vacío de -10 mmHg durante 25 minutos. Finalmente, los analitos retenidos se eluyeron con 2 mL de metanol:diclorometano 1:1 (v/v) y 4 mL de diclorometano, que se evaporaron hasta sequedad en rotavapor a 40°C y 500 mbar. El residuo se disolvió en 1 mL de una disolución 1:3 (v/v) agua:tetraborato sódico 100 mM a pH 8,5 y se inyectó en el sistema electroforético siguiendo el método REPSM-MEKC-DAD desarrollado. Cuando se aplicaron estas condiciones de extracción, se encontró que prácticamente todos los analitos se podían extraer con porcentajes de recuperación elevados (75-110), excepto el tetradifón (pico 12), cuyo porcentaje de recuperación fue bastante bajo (12%). Como consecuencia, fue necesario estudiar otros protocolos de elución, variando el volumen y el tipo de disolvente orgánico empleado. En este sentido, se realizaron ensayos utilizando metanol, diclorometano, acetato de etilo y acetonitrilo tanto solos como mezclas de los mismos en diferente proporción tomando, en todos los casos, distintos volúmenes comprendidos entre 2 y 10 mL. Los mejores resultados, que permitieron mejorar la extracción del tetradifón y mantener, al mismo tiempo, las elevadas recuperaciones del resto de plaguicidas, se obtuvieron al emplear 2 mL de metanol:diclorometano 1:1 (v/v) y 5 mL de diclorometano. Pero sólo se consiguió mejorar las recuperaciones del tetradifón hasta el 37%. Esta baja recuperación del tetradifón puede ser debida a la mayor hidrofobicidad de este compuesto en relación al resto, como muestra su elevado valor del K_{ow} (ver Tabla IV.1.1). Por tanto, este compuesto podría haber quedado mucho más retenido en el polímero HLB, debido a interacciones hidrofóbicas. Además, es interesante observar que el

tetradifón presenta una estructura molecular muy diferente a la de los restantes analitos (Figura IV.1.1), siendo el único compuesto cuya estructura no presenta átomos de nitrógeno, sino de azufre.

Con objeto de validar el procedimiento de SPE optimizado, se llevó a cabo el correspondiente estudio de recuperaciones. Para ello, se realizaron extracciones de diversas muestras de agua Milli-Q a dos niveles de concentración de cada plaguicida (20 y 30 $\mu\text{g/L}$), cada uno de ellos por triplicado. Los LODs resultantes estuvieron comprendidos entre 1,37 $\mu\text{g/L}$ (azoxistrobin) y 8,76 $\mu\text{g/L}$ (tetradifón) y los porcentajes de recuperación medios se situaron entre el 74 y el 112% (penconazol y carbendazima, respectivamente), excepto en el caso del tetradifón, que oscilaron entre el 22 y el 37%.

Con el fin de obtener factores de preconcentración elevados para todos los analitos se llevó a cabo un estudio del volumen de muestra acuosa a extraer. Para ello, se pasaron por el cartucho volúmenes crecientes de cada muestra (agua mineral, de suministro urbano y de estanque), comprendidos entre 25 y 800 mL. Se encontró que el volumen máximo de agua mineral y de suministro urbano que se podía pasar por el cartucho, manteniendo altos porcentajes de recuperación, era de 500 mL, mientras que el correspondiente al agua de estanque era inferior (250 mL), puesto que se trata de una muestra de matriz más compleja que las anteriores. Volúmenes superiores a estos valores ocasionaron una reducción en los porcentajes de recuperación de los analitos. Es de destacar, también, que para la extracción de los plaguicidas de los tres tipos de aguas fue necesario lavar el cartucho con 1 mL de agua Milli-Q justo antes de la etapa de secado, con el fin de eliminar el mayor número de interferencias de la matriz de la muestra. Volúmenes mayores de lavado provocaron una disminución en las recuperaciones de los analitos.

Una vez desarrollado el método de SPE para la extracción selectiva y cuantitativa de los doce plaguicidas de muestras de agua, se llevó a cabo el estudio de recuperaciones a dos niveles de concentración: 1,5 y 3,0 $\mu\text{g/L}$ (Tabla IV.1.4).

Tabla IV.1.4 Porcentajes de recuperación promedio (n=3), porcentajes de RSD y LODs del procedimiento SPE-REPSM-MEKC-DAD aplicado a aguas mineral, de suministro urbano y de estanque.

Plaguicida	Agua mineral			Agua de suministro urbano			Agua de estanque		
	Recuperación (%)	RSD (%)	LOD (ng/L)	Recuperación (%)	RSD (%)	LOD (ng/L)	Recuperación (%)	RSD (%)	LOD (ng/L)
Carbendazima	107	5,2	403	77	6,5	558	-	-	-
Pirimicarb	100	2,0	234	96	1,2	244	107	1,4	439
Metaxil	103	2,4	83	112	2,3	76	110	1,2	154
Pirimetanil	97	2,4	175	88	2,8	193	92	3,3	367
Procimidona	81	1,8	150	89	6,2	136	59	4,3	411
Nuarimol	94	3,3	81	104	5,8	73	90	1,7	169
Azoxistrobin	95	1,4	70	105	2,0	64	78	2,1	172
Tebufenocida	84	6,2	95	104	5,9	76	66	3,5	242
Fenarimol	70	3,2	109	97	2,8	79	75	2,9	203
Benalaxil	78	1,4	114	95	2,9	94	63	2,3	282
Penconazol	71	0,5	140	83	3,3	119	57	2,1	347
Tetradión	21	9,5	615	50	4,2	257	27	4,7	927

Datos correspondientes a una concentración de 3,0 µg/L.

En dicha tabla se muestran los porcentajes de recuperación, RSD y LODs obtenidos para los doce plaguicidas extraídos de muestras de agua mineral, de suministro urbano y de estanque, tras aplicar el procedimiento SPE-REPSM-MEKC-DAD desarrollado, para una concentración de 3,0 $\mu\text{g/L}$ (los resultados correspondientes al otro nivel de concentración fueron muy similares). Cada muestra fue extraída tres veces ($n=3$) e inyectada en el sistema de CE por triplicado siguiendo el método REPSM-MEKC-DAD estudiado. Como puede observarse en la Tabla IV.1.4, los porcentajes de recuperación promedio estuvieron comprendidos entre el 57% (penconazol) y el 112% (metalaxil) para todos los plaguicidas en las diferentes muestras de agua, excepto para el tetradifón, que oscilaron entre el 21% y el 50%. En cuanto a los LODs, estos valores oscilaron entre 70 y 615 ng/L para el agua mineral, entre 64 y 558 ng/L para el agua de suministro urbano y entre 154 y 927 ng/L para el agua de estanque, valores mucho más bajos que los obtenidos habitualmente cuando se utiliza la CE como técnica de separación.

La Figura IV.1.10 muestra los electroferogramas obtenidos para una muestra de agua mineral enriquecida a una concentración de 1,5 $\mu\text{g/L}$ (Figura IV.1.10A) y no enriquecida (Figura IV.1.10B).

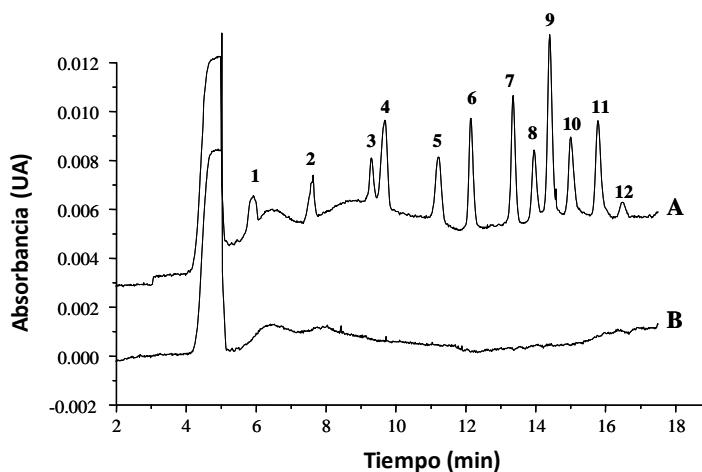


Figura IV.1.10 Electroferogramas de una muestra de agua mineral después de someterla al procedimiento SPE-REPSM-MEKC-DAD: (A) enriquecida (1,5 $\mu\text{g/L}$). (1) Carbendazima, (2) pirimicab, (3) metalaxil, (4) pirimetanil, (5) procimidona, (6) nuarimol, (7) azoxistrobin, (8) tebufenocida, (9) fenarimol, (10) benalaxil, (11) penconazol y (12) tetradifón. (B) No enriquecida.

Como puede apreciarse en la Figura IV.1.10B, la muestra analizada no contenía ninguno de los plaguicidas de estudio. Tampoco existía interferencia alguna por parte de la matriz de la muestra con los plaguicidas de estudio. Asimismo, se observa que los doce plaguicidas pueden ser detectados en muestras de agua mineral utilizando la metodología SPE-REPSM-MEKC-DAD desarrollada (Figura IV.1.10A).

En lo que respecta a las muestras de agua de suministro urbano, los resultados obtenidos fueron similares al caso anterior. En la Figura IV.1.11 pueden observarse los electroferogramas obtenidos al aplicar la metodología SPE-REPSM-MEKC-DAD a una muestra de agua de suministro urbano enriquecida a una concentración de 1,5 µg/L (Figura IV.1.11A) y no enriquecida (Figura IV.1.11B). Al igual que en las muestras de agua mineral, se pudieron detectar los doce plaguicidas en aguas de suministro urbano haciendo uso del procedimiento SPE-REPSM-MEKC-DAD desarrollado (Figura IV.1.11A), aunque en este caso se observó una mayor irregularidad de la línea base, como consecuencia del efecto matriz existente en estas muestras. A pesar de ello, la inyección del blanco (Figura IV.1.11B) mostró que dichas muestras también carecían de interferencias que dificultasen la detección y cuantificación de los plaguicidas de estudio.

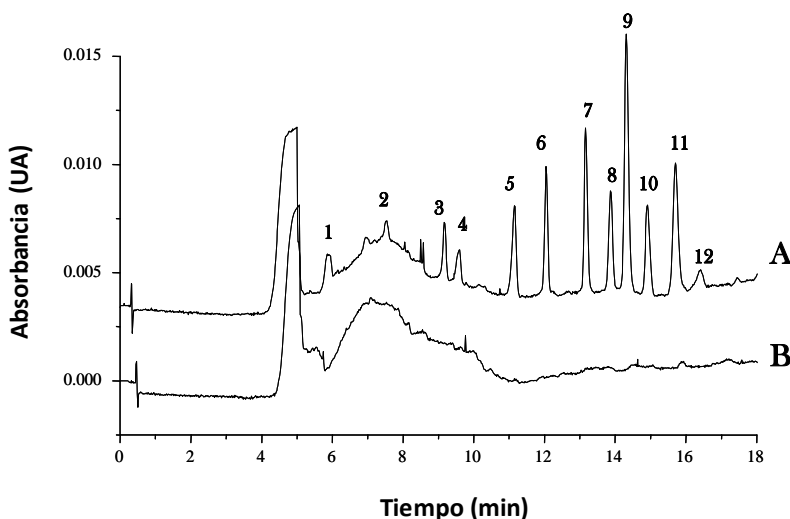


Figura IV.1.11 Electroferogramas de una muestra de agua de suministro urbano después de someterla al procedimiento SPE-REPSM-MEKC-DAD: (A) enriquecida (1,5 µg/L). Identificación: ver Figura IV.1.10. (B) No enriquecida.

La Figura IV.1.12, por su parte, muestra los electroferogramas correspondientes a una muestra de agua de estanque enriquecida a una concentración de 3,0 $\mu\text{g/L}$ (Figura IV.1.12A) y no enriquecida (Figura IV.1.12B).

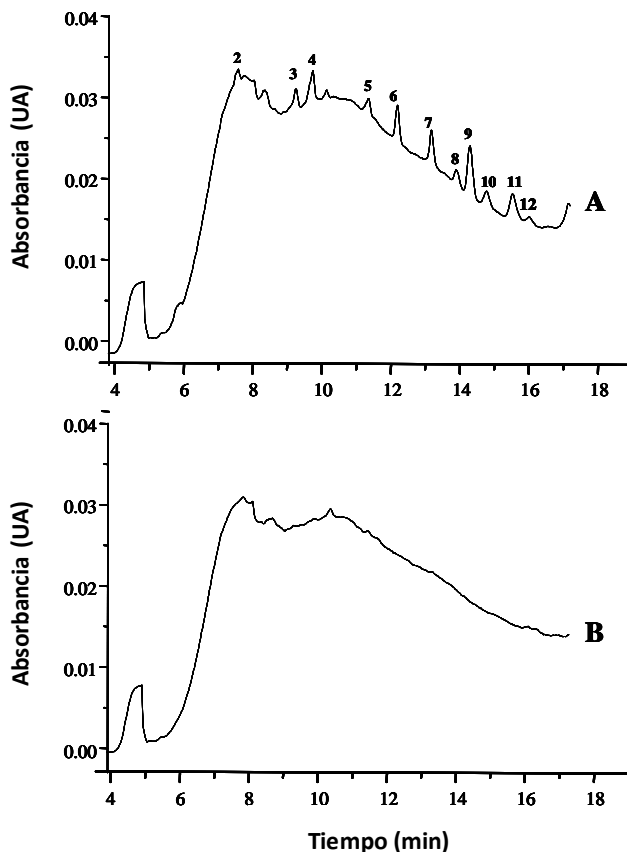


Figura IV.1.12 Electroferogramas de una muestra de agua de estanque después de someterla al procedimiento SPE-REPSM-MEKC-DAD: (A) enriquecida (3,0 $\mu\text{g/L}$). Identificación: ver Figura IV.1.10. (B) No enriquecida.

Puede apreciarse que, al aplicar la metodología SPE-REPSM-MEKC-DAD a este tipo de muestras, se presenta un ligero aumento de los tiempos de migración de los analitos y un claro desplazamiento de la línea base. Esto se podría deber, en gran medida, a la complejidad de la matriz de la muestra que presenta un elevado contenido de materia orgánica, fundamentalmente ácidos húmicos procedentes del suelo (Pokorná y col., 2000). Este efecto de la matriz de la muestra ya había sido observado por Hernández-Borges y col. (2005b) en la extracción de un grupo de

herbicidas en matrices similares a las utilizadas en la presente investigación. En cualquier caso, el efecto matriz observado en las muestras de agua de estanque no fue impedimento a la hora de detectar y cuantificar los analitos en ellas. De hecho todos los plaguicidas, a excepción de la carbendazima, pudieron ser cuantificados en este tipo de muestras tras aplicar la metodología SPE-REPSM-MEKC-DAD desarrollada (Figura IV.1.12A). Además, en la Figura IV.1.12B puede apreciarse que ninguno de los analitos se encontraba presente en las muestras de agua de estanque y que no existía interferencia de la matriz de la muestra que impidiera una correcta identificación y cuantificación de ninguno de los analitos.

IV.1.5 Conclusiones

- Se ha desarrollado una nueva metodología analítica para la determinación simultánea de doce plaguicidas comúnmente utilizados en las Islas Canarias (carbendazima, pirimicarb, metalaxil, pirimetanil, procimidona, nuarimol, azoxistrobin, tebufenocida, fenarimol, benalaxil, penconazol y tetradifón) en aguas minerales, de suministro urbano y de estanque haciendo uso de la MEKC.
- Las mejores condiciones de la separación electroforética fueron obtenidas haciendo uso de un BGE constituido por tetraborato sódico 100 mM y SDS 30 mM a pH 8,5, con un 6% (v/v) de 1-propanol.
- El método desarrollado combina el uso de la MEKC con técnicas de preconcentración en línea (REPSM) y fuera de línea (SPE).
- Se estudiaron dos técnicas de preconcentración en línea, NSM y REPSM, de las cuales la última proporcionó los mejores resultados en términos de resolución, eficacia, tiempos de análisis y sensibilidad, permitiendo obtener LODs comprendidos entre 33,6 y 216 µg/L, lo que supuso una mejora de sensibilidad de hasta 105 veces con respecto a condiciones sin *stacking*.
- El nuevo método SPE-REPSM-MEKC-DAD desarrollado se aplicó a la determinación de los doce plaguicidas en muestras de agua mineral, de suministro urbano y de estanque, con porcentajes de recuperación entre 70 y

107%, 77 y 112%, y entre 57 y 110%, respectivamente (excepto para el tetradifón, que fueron: 21, 50 y 27%, respectivamente). Este método permitió alcanzar LODs comprendidos entre 64 ng/L (azoxistrobin) y 927 ng/L (tetradifón), en las diferentes muestras de agua.

IV.2 Análisis de plaguicidas en vinos blancos, rosados y tintos mediante el uso combinado de la microextracción en fase sólida, *stacking* y cromatografía electrocinética micelar.

En esta sección se presenta la determinación del grupo de doce plaguicidas utilizado en la sección anterior en muestras de origen agroalimentario, concretamente en vinos blancos, rosados y tintos haciendo uso de la MEKC-DAD. La etapa de extracción y preconcentración de la muestra se llevó a cabo utilizando la SPME y el REPSM como técnicas de preconcentración fuera de línea y en línea, respectivamente. Los parámetros de la SPME se optimizaron mediante un diseño experimental. El método SPME-REPSM-MEKC-DAD desarrollado permitió la determinación de estos doce plaguicidas en vinos a niveles inferiores a sus LMRs permitidos en uvas de vinificación.

IV.2.1 Antecedentes

A lo largo de su ciclo productivo, la vid puede verse afectada por distintas enfermedades relacionadas con ataques de virus, hongos, bacterias, ácaros e insectos. Entre ellas las más frecuentes son las generadas por hongos que son responsables de importantes pérdidas de cosecha, especialmente en zonas de humedades relativamente altas y temperaturas suaves. Para combatir estas enfermedades, se ha extendido el uso de plaguicidas, especialmente fungicidas, en la actividad vitícola. Si la aplicación de estos productos en la vid se lleva a cabo de manera incorrecta, utilizando dosis más altas de las recomendadas, haciendo uso de productos no autorizados para tal fin, etc., o bien si no se respetan los tiempos de seguridad indicados entre aplicaciones, es posible que puedan quedar residuos de plaguicidas en las uvas y, como consecuencia, que aparezcan en el mosto e incluso en el vino (Cabras y col., 1997; Navarro y col., 1999).

La presencia de residuos de plaguicidas en los vinos depende de diversos factores, tantos como el número de etapas que constituyan el proceso de producción (Otteneder y Majerus, 2005) y puede traer consigo consecuencias toxicológicas y problemas que supongan un detrimento de su calidad. De hecho,

algunos autores han observado que la calidad aromática del vino puede verse modificada por la presencia de residuos de plaguicidas durante el proceso de fermentación (Oliva y col., 2001; García y col., 2004). También se ha observado que la presencia de algunos productos de degradación de los plaguicidas puede influir negativamente en la estabilidad y calidad final del vino, por ejemplo, en la aparición de turbidez. Por todo ello, la determinación de este tipo de compuestos es un parámetro a tener en cuenta en el control de calidad de los vinos. En Canarias, esta cuestión ha adquirido una importancia relevante, tanto por tratarse de la Comunidad Autónoma con mayor consumo de plaguicidas de toda España como por el hecho de que la vid constituye uno de los cultivos mayoritarios de las islas (ver sección I.1.6).

Con el fin de proteger la salud de los consumidores se ha regulado el uso de los plaguicidas en la actividad vitícola y se han establecido LMRs para uvas de mesa y de vinificación. Sin embargo, a pesar de los efectos que estos compuestos tienen sobre el vino y el riesgo que plantea su consumo, actualmente no existe ningún documento normativo por el que se establezcan LMRs de plaguicidas específicos para el vino. Sólo algunos países como Suiza han tomado la iniciativa de fijar sus propios LMRs (*Ordonnance sur les substances étrangères et les composants*, OSEC, 1995). En los demás países, entre ellos España, se han considerado (aunque sin indicación expresa por parte de las autoridades) como límites indicativos los LMRs establecidos para uvas de vinificación.

Generalmente, el análisis de residuos de plaguicidas en vino se ha llevado a cabo por GC (Rial-Otero y col., 2002; Schellin y col., 2004) y HPLC (Goto y col., 2005; Nozal y col., 2005). En lo que respecta a la CE, a pesar de que esta técnica complementa y, en algunos casos, sustituye a los métodos cromatográficos, prácticamente no se ha empleado en la determinación de plaguicidas en muestras de vino. De hecho, únicamente existe un trabajo en la literatura sobre el análisis de un reducido grupo de plaguicidas en vinos blancos por CE (Molina-Mayo y col., 2007). Una de las principales causas podría estar asociada a que, comparada con otras técnicas como GC o HPLC, la CE presenta una menor sensibilidad, aunque este inconveniente se ha solventado haciendo uso de diferentes estrategias de

preconcentración, tanto en línea como fuera de línea. Entre ellas, la SPME ha resultado ser un procedimiento interesante para la extracción y preconcentración de plaguicidas de distintas muestras, especialmente muestras complejas. Sin embargo, hasta el momento en muy pocos trabajos se ha utilizado la SPME como etapa previa a la determinación de plaguicidas por CE (Rodríguez y col., 2003; Frías-García y col., 2004; Hernández-Borges y col., 2004b, 2005a; Molina-Mayo y col., 2007). Como consecuencia, se hace necesario profundizar en este campo con objeto de extender el uso conjunto de ambas técnicas para desarrollar métodos más sensibles y selectivos en matrices altamente complejas, como es el caso de los vinos. Hasta el desarrollo de la presente Tesis Doctoral, sólo se había publicado un trabajo sobre la aplicación de la SPME en la extracción y preconcentración de plaguicidas de muestras de vino y su posterior determinación por CE (Molina-Mayo y col., 2007), si bien en ese caso únicamente se analizaron cinco plaguicidas (ciprodinil, pirimicarb, pirimetanil, procimidona y nuarimol) en muestras de vino blanco.

Con objeto de extender la aplicación de la CE al análisis de un número relativamente elevado de plaguicidas en vinos, se seleccionó el mismo grupo de analitos empleado en la sección anterior (carbendazima, pirimicarb, metalaxil, pirimetanil, procimidona, nuarimol, azoxistrobin, tebufenocida, fenarimol, benalaxil, penconazol y tetradifón). Estos compuestos son, en su mayoría, fungicidas que, como se ha mencionado anteriormente, se utilizan de manera habitual en las Islas Canarias, especialmente en la producción vitivinícola. La Tabla IV.2.1 muestra, para cada plaguicida, los LMRs permitidos por la legislación española y europea en el momento de la realización de este estudio, así como por el *Codex Alimentarius* en uvas de vinificación.

IV.2.2 Optimización del procedimiento de SPME

Con el fin de maximizar la extracción y preconcentración de los doce plaguicidas de muestras de vino blanco, rosado y tinto, se desarrolló un método de SPME previo a la determinación electroforética, optimizada en la sección anterior.

Tabla IV.2.1 LMRs de los plaguicidas de estudio en uvas de vinificación en el momento de la realización de este estudio (2007).

Plaguicida	LMRs (mg/kg)*		
	Legislación española	Legislación europea	Codex Alimentarius
Carbendazima	2	0,5	-
Pirimicarb	0,5	-	-
Metalaxil	1	1	1
Pirimetanil	5	-	-
Procimidona	5	5	5
Nuarimol	0,2	-	-
Azoxistrobin	2	2	-
Tebufenocida	0,5	-	2
Fenarimol	0,3	0,3	0,3
Benalaxil	0,2	0,2	0,2
Penconazol	0,2	0,2	0,2
Tetradifón	2	-	-

* Según datos del MAPA, de la Comisión Europea y del Codex Alimentarius.

El desarrollo de cualquier procedimiento para la determinación de plaguicidas haciendo uso de la SPME requiere la optimización de una serie de factores que influyen de manera importante sobre la extracción y desorción de los analitos tales como: tipo de fibra, tiempo de extracción, temperatura del proceso de extracción, pH y fuerza iónica de la muestra, disolvente o temperatura de desorción (dependiendo de si se trata o no de desorción térmica, utilizada sólo en GC) y el tiempo de desorción de los analitos.

Inicialmente, con objeto de seleccionar la fibra más adecuada, se realizaron una serie de experiencias con cuatro fibras diferentes: PDMS, PDMS/DVB, PA y CW/TPR, que son, en la actualidad, las únicas fibras disponibles comercialmente para la desorción de los analitos con disolventes orgánicos. Estos ensayos iniciales se llevaron a cabo sumergiendo directamente la fibra en 10 mL de una muestra de agua Milli-Q enriquecida con los doce plaguicidas a una concentración de 300 µg/L, a diferentes valores de pH (2,5, 6,0 y 9,0) y en presencia de un 15% (p/v) de cloruro sódico para favorecer el efecto *salting-out*. La extracción se llevó a cabo a temperatura ambiente bajo agitación constante de 900 rpm durante 90 minutos, y

la desorción durante 16 minutos bajo agitación constante a 1000 rpm. Como disolvente de desorción se utilizó 1 mL de metanol, ya que que los analitos presentan una elevada solubilidad en el mismo (*The e-pesticide manual*, 2001). La Figura IV.2.1 muestra los resultados obtenidos en estos estudios iniciales (expresados como área de pico). Como puede deducirse, la fibra que mostró una mayor capacidad de extracción para la mayoría de los plaguicidas estudiados fue la de PDMS/DVB. Sin embargo, las áreas fueron muy bajas para los tres primeros analitos (carbendazima, pirimicarb y metalaxil) e, incluso, algunos de ellos no se pudieron extraer de la muestra, al menos bajo estas condiciones preliminares. Esto puede explicarse teniendo en cuenta sus valores de K_{ow} , que son los más bajos del grupo (ver Tabla IV.1.1) por lo que su afinidad por las fibras de SPME no es muy elevada. A la vista de esa figura también se deduce que la capacidad de extracción de estos plaguicidas por la fibra de PA es mayor que la de la fibra de PDMS, aunque en ambos casos menor que la de las fibras de CW/TPR y PDMS/DVB. El hecho de obtener extracciones mayores de los analitos en fibras en las que se combina más de un polímero, ya había sido descrito (Kataoka y col., 2000). A diferencia de las fibras de PA y PDMS, en las que la extracción se debe principalmente a un proceso de absorción, en las fibras de CW/TPR y PDMS/DVB la principal interacción entre éstas y los analitos se produce por un fenómeno de adsorción, ya que se trata de polímeros sólidos muy porosos (Pawliszyn, 1997; Gorecki y col., 1999). Además, utilizando la fibra de PDMS/DVB se pudieron extraer 10 de los 12 plaguicidas, por lo que se seleccionó dicha fibra para realizar las siguientes experiencias, a pesar de que la fibra de CW/TPR había proporcionado extracciones de tebufenocida y fenarimol ligeramente superiores a ésta en todo el rango de pHs estudiado.

Una vez seleccionada la fibra, se realizaron otros ensayos preliminares que permitieran determinar el mejor disolvente para la desorción. Para ello, se estudió el uso de 1 mL de metanol, acetonitrilo (dado que los analitos presentan una elevada solubilidad en ellos) y de la disolución utilizada para el *stacking* (1:3 (v/v) agua:tetraborato sódico 100 mM a pH 8,5). Las extracciones de la muestra se realizaron a pH 9,0, ya que en los ensayos anteriores se había observado que a este valor de pH las eficacias eran más altas.

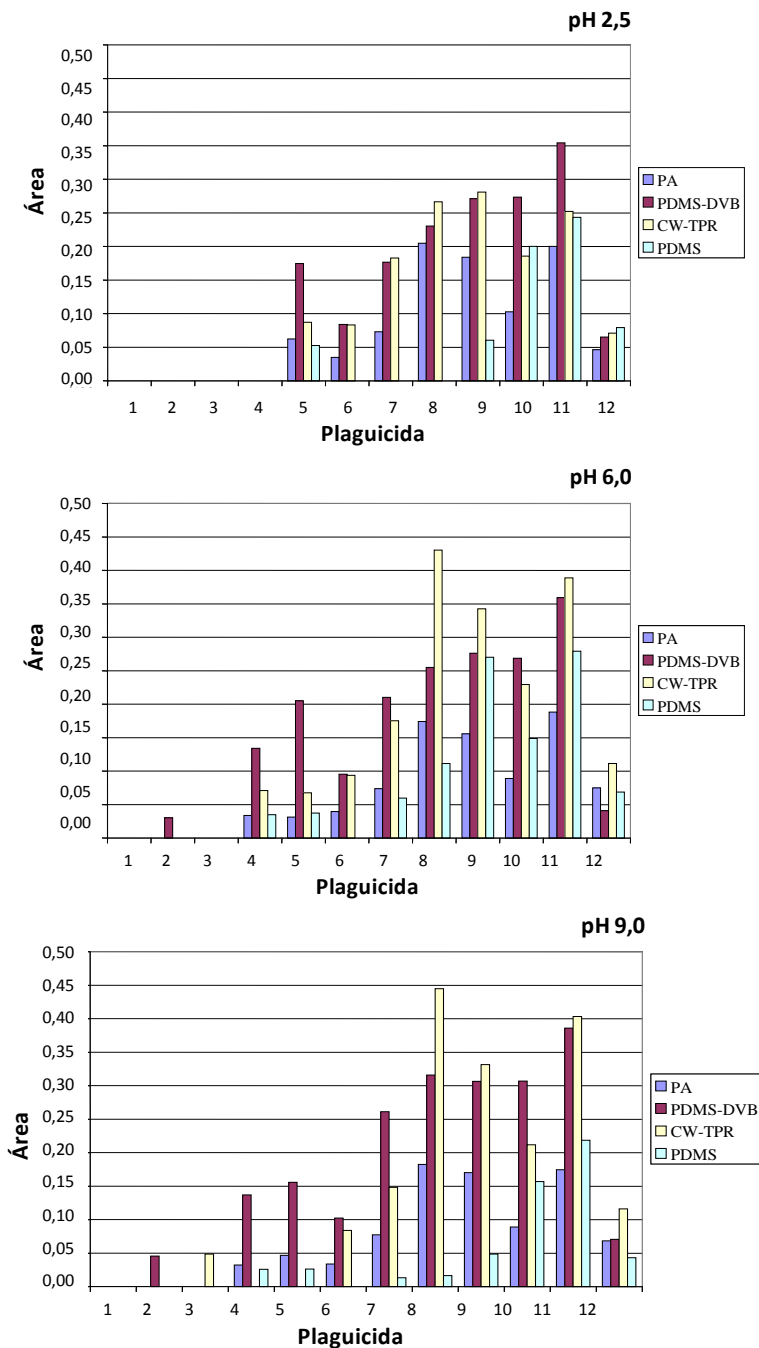


Figura IV.2.1 Influencia del tipo de fibra (PA, PDMS/DVB, CW/TPR y PDMS) en la extracción de los doce plaguicidas de 10 mL de agua Milli-Q a diferentes pH (2,5, 6,0 y 9,0) y con un 15% (p/v) de NaCl. Extracción: 90 minutos a 900 rpm. Desorción: 16 minutos a 1000 rpm en 1 mL de metanol. Muestra: 300 µg/L de cada plaguicida. (1) Carbendazima, (2) pirimicab, (3) metalaxil, (4) pirimetanil, (5) procimidona, (6) nuarimol, (7) azoxistrobin, (8) tebufenocida, (9) fenarimol, (10) benalaxil, (11) penconazol y (12) tetradifón.

La Figura IV.2.2 muestra el efecto del disolvente de desorción. Como puede observarse, el metanol proporcionó las áreas de pico más elevadas, por lo que fue seleccionado para llevar a cabo las experiencias posteriores.

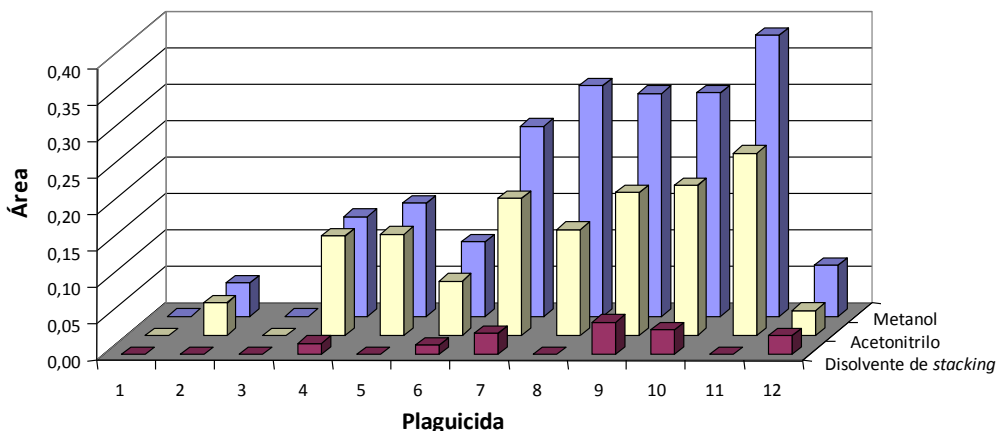


Figura IV.2.2 Estudio del efecto del disolvente de desorción (metanol, acetonitrilo y disolvente de stacking). Extracción de los doce plaguicidas de 10 mL de agua Milli-Q a pH 9,0, con un 15% (p/v) de NaCl, durante 90 minutos a 900 rpm. Desorción: 16 minutos a 1000 rpm en 1 mL de disolvente. Muestra: 300 µg/L de cada plaguicida. Identificación: ver Figura IV.2.1.

También se estudió la influencia de la temperatura en el proceso de extracción y, así, se realizaron experimentos a temperaturas comprendidas entre 25 y 50°C observando que, para la mayoría de plaguicidas, la eficacia de la adsorción era similar, excepto para la procimidona, el azoxistrobin y la tebufenocida, que disminuían al incrementar la temperatura, por tanto, los siguientes ensayos se realizaron a temperatura ambiente, aproximadamente 25°C.

Una vez realizados estos estudios iniciales, se llevó a cabo la optimización de los principales parámetros que afectan a los procesos de extracción y desorción (pH, porcentaje de NaCl y tiempos de extracción y desorción) haciendo uso de un diseño experimental del tipo diseño compuesto centrado, constituido por un diseño factorial completo de cuatro factores (2^4) y un diseño en estrella con tres puntos centrales (distancia axial igual a 2). En total se realizaron 27 experimentos en los que el pH se modificó entre 5,5 y 9,5, el porcentaje de NaCl entre 0 y 30% (p/v), el tiempo de extracción entre 0 y 150 minutos y el tiempo de desorción entre 0 y 36 minutos. En la Tabla IV.2.2 pueden observarse los niveles de los factores del

diseño compuesto centrado utilizado. Estos niveles se seleccionaron teniendo en cuenta los experimentos iniciales realizados y algunos estudios de la bibliografía sobre la extracción de plaguicidas por SPME (Hernández-Borges y col., 2004b, 2005a; Frías-García y col., 2004). Los 27 experimentos se llevaron a cabo utilizando muestras de agua Milli-Q que contenían un 12% (v/v) de etanol y los doce plaguicidas a una concentración de 300 µg/L. La adición de etanol se realizó para tener en cuenta cómo influye en la extracción su presencia en las muestras de vino, ya que este compuesto, que es uno de sus constituyentes mayoritarios, puede originar variaciones en los coeficientes de reparto de los plaguicidas entre la fase estacionaria y las disoluciones acuosas. En general, la presencia de etanol tanto en disoluciones acuosas como en vinos origina una disminución de la eficacia de extracción de los analitos por SPME (Urruty y Montury, 1996).

Tabla IV.2.2 Parámetros de la extracción y niveles de los factores utilizados en el diseño compuesto centrado.

Factor	Diseño compuesto centrado			
	Diseño factorial completo		Diseño en estrella	
	Nivel bajo	Nivel alto	Nivel bajo	Nivel alto
pH	6,5	8,5	5,5	9,5
Porcentaje de NaCl	7,5	22,5	0	30
Tiempo de extracción (min)	37,5	112,5	0	150
Tiempo de desorción (min)	9	27	0	36

Una vez realizadas todas las experiencias, se utilizó el programa *StatGraphics Plus 5.1* para el análisis del diseño experimental. Para ello, se introdujeron como respuesta las áreas de pico individuales de los once plaguicidas extraídos así como su suma, con objeto de obtener las condiciones óptimas de la extracción, además de las correspondientes superficies de respuesta en cada caso. Los resultados del diseño experimental analizados para cada plaguicida individualmente mostraron que los valores óptimos para los tiempos de extracción estaban comprendidos entre 130 y 150 minutos, mientras que los porcentajes de NaCl se situaban entre el 25 y el 30% (p/v) para la mayoría de ellos. Además, se encontró que valores bajos de pH y altos de tiempos de desorción eran los adecuados para la extracción de aquellos con bajos K_{ow} (pirimicarb y metalaxil)

junto con el pirimetanil. A pesar de estos resultados, la complejidad de desarrollar la extracción simultánea de plaguicidas de diferentes propiedades requirió un compromiso entre las condiciones de extracción óptimas. Por esta razón se eligió la suma de las áreas de pico como respuesta global. La Figura IV.2.3 muestra las superficies de respuesta del proceso. En general, tiempos de extracción, pHs y porcentajes de NaCl elevados proporcionaron las mayores extracciones de los analitos.

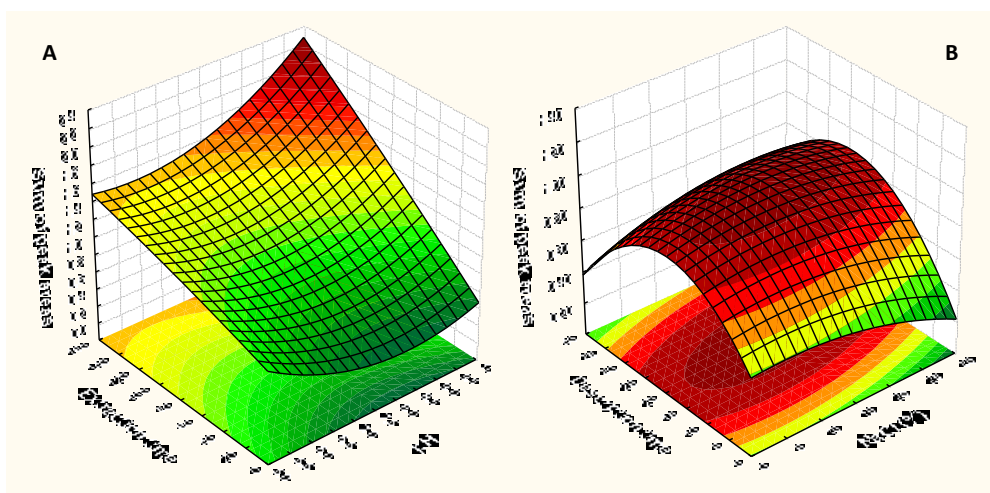


Figura IV.2.3 Superficies de respuesta estimadas para el diseño compuesto centrado. (A) Suma de las áreas de pico frente al tiempo de extracción (minutos) y al pH. (B) Suma de las áreas de pico frente al tiempo de desorción (minutos) y al porcentaje de NaCl.

La combinación de factores que, de acuerdo con el programa, proporciona la mayor respuesta fue la siguiente: extracción a pH 9,5 con un 30% (p/v) de NaCl durante 143 minutos y desorción en metanol durante 13 minutos. Cuando se llevó a cabo la extracción bajo estas condiciones óptimas, se encontró que efectivamente las mismas proporcionaban la mayor extracción de todos los plaguicidas. La Figura IV.2.4 muestra los electroferogramas obtenidos tras la extracción de una muestra de agua Milli-Q enriquecida con los plaguicidas en estudio y que contenía un 12% (v/v) de etanol, bajo las condiciones de extracción óptimas (Figura IV.2.4A) y otras condiciones (no óptimas) correspondientes a un experimento del diseño (Figura IV.2.4B). Se observa claramente cómo las

condiciones de extracción óptimas proporcionan mejores resultados en términos de eficacia y respuesta electroforética en la extracción de los analitos.

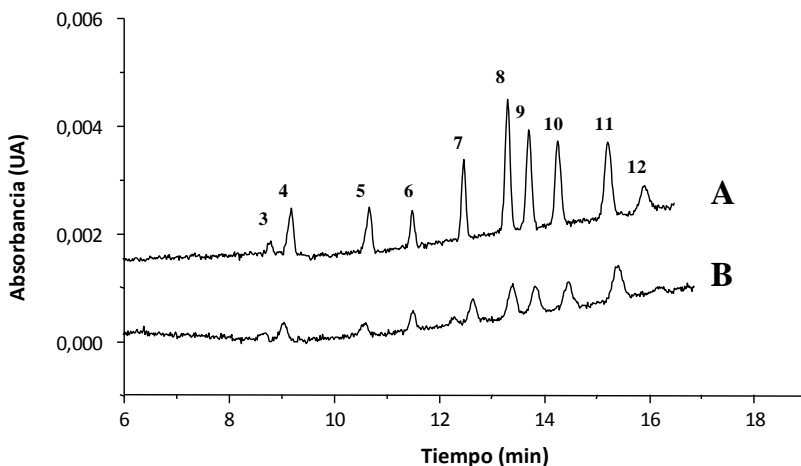


Figura IV.2.4 Electroferogramas de la separación de diez de los doce plaguicidas por SPME-REPSM-MEKC-DAD en muestras de agua Milli-Q conteniendo un 12% (v/v) de etanol y 300 µg/L de cada plaguicida, bajo condiciones de extracción (A) óptimas (Extracción: pH 9,5, 30% (p/v) de NaCl, 143 minutos a 900 rpm. Desorción en metanol durante 13 minutos a 1000 rpm) y (B) y no óptimas (Extracción: pH 6,5, 22,5% (p/v) de NaCl, 37,5 minutos a 900 rpm. Desorción en metanol durante 9 minutos a 1000 rpm). Muestra disuelta en 1:3 (v/v) agua:tetraborato sódico 100 mM a pH 8,5. Restantes condiciones experimentales: ver Figura IV.1.9. Identificación: ver Figura IV.2.1.

IV.2.3 Validación del método

Junto con el etanol, el vino presenta muchos otros compuestos que podrían interferir en el procedimiento de SPME optimizado para la extracción y preconcentración de los doce plaguicidas. Por esta razón, se estudió el efecto matriz de cada tipo de vino (blanco, rosado y tinto) en la calibración. Esta evaluación se llevó a cabo comparando estadísticamente las rectas de calibrado de las diferentes muestras de vino (calibrado con la matriz) con las de la disolución hidroalcohólica (agua Milli-Q con un 12% v/v de etanol). Para ello se llevó a cabo la extracción de cada tipo de matriz de acuerdo con las condiciones anteriormente descritas y se enriqueció el extracto final. Hay que señalar que inicialmente se realizaron extracciones de las muestras de vino sin enriquecer para comprobar la ausencia de los analitos en ellas.

En la Tabla IV.2.3 pueden observarse los resultados del estudio de calibración (basado en áreas de pico) obtenidos a partir de la inyección, por triplicado, de muestras de vino blanco, rosado y tinto enriquecidas con los doce analitos a distintos niveles de concentración ($n=5$). En dicha tabla se muestran los rangos de concentración estudiados, los parámetros estadísticos calculados a partir de la regresión de mínimos cuadrados y la evaluación del efecto matriz en cada caso. Como puede observarse, se obtuvo una buena linealidad para todos los plaguicidas estudiados en las distintas matrices, con coeficientes de correlación (R) superiores a 0,992 en todos los casos. También se observó que, a pesar de que el metalaxil pudo ser extraído de la disolución hidroalcohólica, esto no sucedía en las muestras de vino, ni siquiera en las enriquecidas con altas concentraciones de plaguicida.

Para llevar a cabo la comparación estadística entre el calibrado con la matriz y el calibrado con la disolución hidroalcohólica se utilizó el programa *StatGraphics Plus 5.1*, que permitió calcular los valores F y p necesarios para comparar las pendientes y las ordenadas en el origen en cada caso. En general, se considera que existe una diferencia estadística significativa entre las pendientes y las ordenadas en el origen cuando los valores p son menores o iguales a 0,1. Teniendo esto en cuenta, se observó un fuerte efecto matriz en los tres tipos de vino, que resultó ser mayor en las muestras de vino tinto (efecto matriz para todos los plaguicidas) y menor en las de vino blanco (efecto matriz para siete plaguicidas). De hecho, en todos los casos se observaron diferencias significativas entre las pendientes y las ordenadas en el origen, excepto para tebufenocida, penconazol y tetradifón en vino blanco, así como procimidona en vino rosado (ver Tabla IV.2.3). Por tanto, fue necesario desarrollar una calibración específica para cada tipo de matriz (calibrado con la matriz) y utilizarla para cuantificar los plaguicidas en las muestras de vino. El fuerte efecto matriz observado, sobre todo en las muestras de vino tinto, podría estar relacionado con su elevado contenido de otros constituyentes además del etanol (polifenoles, taninos, tartratos, azúcares, etc.), que podrían interferir en la extracción de los plaguicidas, tal como han indicado otros autores (Urruty y Montury, 1996).

Tabla IV.2.3 Datos de calibración del método SPME-REPSM-MEKC-DAD y evaluación del efecto matriz.

Plaguicida	Matriz	Rango (mg/L)*	b (S _b)	a (S _a)	R	Efecto matriz**
Carbendazima	-	-	-	-	-	-
Pirimicarb	D.H.***	0,113-1,13	0,018 (0,001)	0,005 (0,001)	0,996	-
	Vino blanco	0,113-1,13	0,017 (0,001)	0,002 (0,000)	0,998	Sí
	Vino rosado	1,02-8,94	0,017 (0,001)	0,011 (0,003)	0,995	Sí
	Vino tinto	4,75-8,94	0,004 (0,000)	0,020 (0,000)	0,999	Sí
Metalaxil	D.H.***	0,300-1,95	0,020 (0,001)	0,016 (0,001)	0,996	-
	Vino blanco	-	-	-	-	-
	Vino rosado	-	-	-	-	-
	Vino tinto	-	-	-	-	-
Pirimetanil	D.H.***	0,115-2,10	0,332 (0,017)	0,013 (0,018)	0,996	-
	Vino blanco	0,115-2,10	0,148 (0,006)	0,041 (0,007)	0,997	Sí
	Vino rosado	0,107-1,68	0,405 (0,020)	-0,140 (0,023)	0,994	Sí
	Vino tinto	0,419-2,50	0,087 (0,003)	0,097 (0,004)	0,998	Sí
Procimidona	D.H.***	0,105-2,10	0,610 (0,021)	-0,011 (0,023)	0,998	-
	Vino blanco	0,105-2,10	0,491 (0,024)	0,010 (0,015)	0,999	Sí
	Vino rosado	0,050-1,25	0,567 (0,020)	-0,011 (0,012)	0,995	No
	Vino tinto	0,270-2,50	0,165 (0,003)	0,129 (0,003)	0,999	Sí
Nuarimol	D.H.***	0,098-1,95	0,228 (0,009)	0,026 (0,009)	0,998	-
	Vino blanco	0,098-1,95	0,176 (0,005)	0,009 (0,005)	0,999	Sí
	Vino rosado	0,102-1,41	0,257 (0,006)	-0,021 (0,004)	0,998	Sí
	Vino tinto	0,523-1,41	0,040 (0,002)	0,032 (0,002)	0,997	Sí
Azoxistrobin	D.H.***	0,083-1,65	0,494 (0,016)	0,003 (0,014)	0,998	-
	Vino blanco	0,083-1,65	0,466 (0,006)	-0,004 (0,005)	0,999	Sí
	Vino rosado	0,050-1,65	0,426 (0,006)	-0,031 (0,005)	0,999	Sí
	Vino tinto	0,295-1,65	0,080 (0,004)	0,108 (0,005)	0,996	Sí
Tebufenocida	D.H.***	0,105-1,05	0,373 (0,034)	0,061 (0,037)	0,998	-
	Vino blanco	0,105-2,10	0,376 (0,013)	0,026 (0,014)	0,998	No
	Vino rosado	0,080-1,00	0,322 (0,011)	0,001 (0,006)	0,994	Sí
	Vino tinto	0,165-1,00	0,307 (0,012)	0,040 (0,008)	0,998	Sí

(Continúa en la página siguiente)

Tabla IV.2.3 (Continuación).

Plaguicida	Matriz	Rango (mg/L)*	b (S _b)	a (S _a)	R	Efecto matriz**
Fenarimol	D.H.***	0,090-1,80	0,437 (0,021)	0,011 (0,019)	0,996	-
	Vino blanco	0,090-1,80	0,513 (0,023)	-0,014 (0,021)	0,997	Sí
	Vino rosado	0,060-1,00	0,493 (0,011)	-0,029 (0,006)	0,997	Sí
	Vino tinto	0,367-1,00	0,035 (0,002)	0,080 (0,001)	0,996	Sí
Benalaxil	D.H.***	0,090-1,80	0,580 (0,024)	-0,002 (0,022)	0,997	-
	Vino blanco	0,090-1,80	0,654 (0,024)	-0,034 (0,022)	0,998	Sí
	Vino rosado	0,080-1,00	0,377 (0,010)	0,006 (0,006)	0,996	Sí
	Vino tinto	0,210-1,00	0,111 (0,006)	0,122 (0,004)	0,996	Sí
Penconazol	D.H.***	0,083-1,65	0,478 (0,029)	0,016 (0,024)	0,995	-
	Vino blanco	0,083-1,65	0,502 (0,015)	-0,009 (0,012)	0,998	No
	Vino rosado	0,080-1,00	0,267 (0,008)	0,016 (0,005)	0,996	Sí
	Vino tinto	0,331-1,00	0,082 (0,003)	0,068 (0,002)	0,998	Sí
Tetradifón	D.H.***	0,113-2,25	0,119 (0,002)	0,046 (0,003)	0,999	-
	Vino blanco	0,113-2,25	0,122 (0,007)	0,033 (0,008)	0,995	No
	Vino rosado	0,500-3,00	0,053 (0,002)	-0,011 (0,004)	0,992	Sí
	Vino tinto	0,700-2,13	0,007 (0,000)	0,073 (0,001)	0,995	Sí

b: pendiente; S_b: desviación estándar de la pendiente; a: ordenada en el origen; S_a: desviación estándar de la ordenada en el origen, R: coeficiente de correlación.

* Rango de concentración estudiado (mg/L).

** Se considera diferencia estadística cuando los valores *p* de la comparación entre las ordenadas en el origen o entre las pendientes son ≤0,1.

*** D.H.:Disolución hidroalcohólica (agua Milli-Q con un 12% v/v de etanol).

En la Figura IV.2.5 pueden observarse los electroferogramas obtenidos tras aplicar el método desarrollado a una muestra de vino blanco enriquecida (A) y no enriquecida (B). Como puede apreciarse, todos los plaguicidas (excepto carbendazima y metalaxil) pudieron extraerse de la muestra sin interferencias de matriz, con tiempos de análisis inferiores a 16 minutos.

Una vez evaluado el efecto matriz, se estudió la precisión y exactitud del método desarrollado. Para ello, se realizaron cinco extracciones consecutivas de las muestras de vino (excepto en vinos rosados, que fueron tres extracciones consecutivas) enriquecidas a diferentes niveles de concentración (ver Tabla IV.2.4). Algunos de estos niveles se seleccionaron con objeto de demostrar la aplicabilidad

del método a concentraciones iguales o muy cercanas a los correspondientes LMRs establecidos para uvas de vinificación.

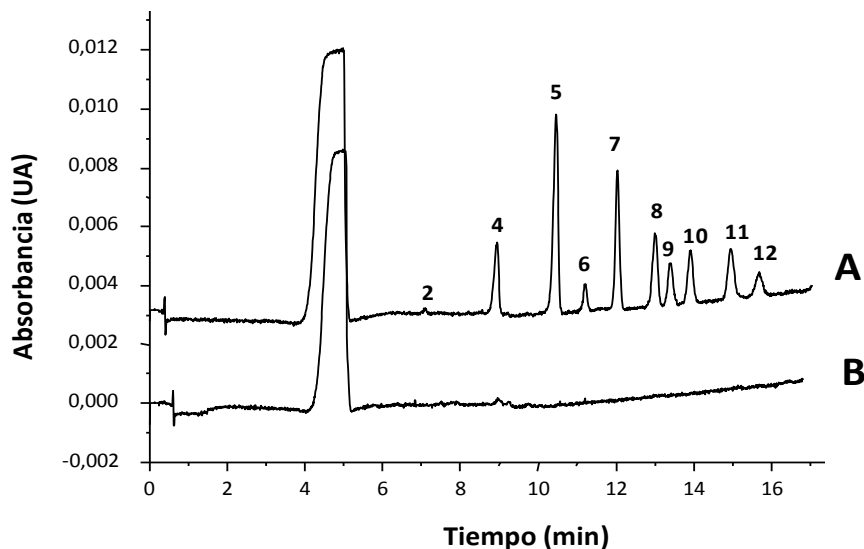


Figura IV.2.5 Electroferogramas obtenidos tras la extracción de una muestra de vino blanco enriquecida (A) y sin enriquecer (B) siguiendo el procedimiento SPME-REPSM-MEKC-DAD propuesto. Extracción: pH 9,5, 30% (p/v) de NaCl, 143 minutos a 900 rpm. Desorción en metanol durante 13 minutos a 1000 rpm. Muestra: (2) pirimicab (2,01 mg/L), (4) pirimetanil y (5) procimidona (1,12 mg/L), (6) nuarimol (0,47 mg/L), (7) azoxistrobin (1,10 mg/L), (8) tebufenocida (0,50 mg/L), (9) fenarimol y (10) benalaxil (0,43 mg/L), (11) penconazol (0,44 mg/L) y (12) tetradifón (1,20 mg/L). Restantes condiciones experimentales: ver Figura IV.1.9.

En la Tabla IV.2.4 se pueden observar los niveles de concentración de cada plaguicida en cada tipo de vino, los LMRs para uvas de vinificación según la legislación española vigente en el momento de la realización de este estudio (año 2007), los LODs del método y los resultados del estudio de precisión y exactitud, que se obtuvieron haciendo uso de una prueba *t-Student* (Miller y Miller, 2002). Como puede apreciarse, en todos los casos los valores experimentales del estadístico *t* fueron inferiores al valor tabulado: 2,78 para $n=5$ (vinos blancos y tintos) y 4,30 para $n=3$ (vinos rosados), a un nivel de confianza del 95%, con lo que la hipótesis nula se puede aceptar (no se observan diferencias significativas entre el valor real y el experimental).

Tabla IV.2.4 Resultados del estudio de precisión y exactitud del método desarrollado para la cuantificación de diez de los doce plaguicidas en muestras de vino blanco, rosado y tinto.

Pico	LMR (mg/kg) ^a	Matriz	Añadida (mg/L) ^b	Encontrada (mg/L) ^c	Recupe- ración (%) ^d	t	LOD (mg/L) ^e
(2)	0,5	Vino blanco	1,00	1,05 ± 0,03	105	1,12	0,113
			2,01	1,93 ± 0,07	96	1,81	
		Vino rosado	3,00	3,03 ± 0,05	101	1,08	0,929
			6,00	6,33 ± 0,34	106	3,63	
			Vino tinto	5,60	5,55 ± 0,14	99	
		6,80		6,72 ± 0,10	99	0,52	
		8,00	8,08 ± 0,24	101	2,33		
(4)	5	Vino blanco	0,56	0,57 ± 0,10	102	2,08	0,113
			1,12	1,20 ± 0,07	107	1,96	
		Vino rosado	0,56	0,58 ± 0,02	104	3,31	0,096
			1,12	1,09 ± 0,03	97	1,15	
		Vino tinto	0,40	0,42 ± 0,06	105	1,40	0,126
			0,83	0,81 ± 0,08	98	1,79	
			1,25	1,21 ± 0,18	97	2,45	
(5)	5	Vino blanco	0,56	0,49 ± 0,02	88	1,71	0,089
			1,12	1,17 ± 0,03	104	0,80	
		Vino rosado	0,56	0,55 ± 0,01	98	1,14	0,040
			1,12	1,10 ± 0,02	98	3,58	
		Vino tinto	0,30	0,28 ± 0,07	93	2,54	0,081
			0,78	0,77 ± 0,04	99	1,48	
			1,25	1,23 ± 0,10	98	1,87	
(6)	0,2	Vino blanco	0,20	0,22 ± 0,02	110	1,48	0,093
			0,47	0,44 ± 0,03	94	0,92	
		Vino rosado	0,20	0,23 ± 0,03	115	1,65	0,091
			0,47	0,50 ± 0,03	106	1,47	
		Vino tinto	0,50	0,48 ± 0,09	96	1,53	0,157
			0,95	0,96 ± 0,05	101	1,41	
			1,40	1,38 ± 0,14	99	1,36	
(7)	2	Vino blanco	0,55	0,51 ± 0,02	93	0,98	0,092
			1,10	1,01 ± 0,06	92	2,04	
		Vino rosado	0,55	0,56 ± 0,01	102	0,22	0,041
			1,10	1,11 ± 0,03	101	1,97	
		Vino tinto	0,30	0,32 ± 0,07	107	1,66	0,089
			0,88	0,87 ± 0,08	99	0,27	
			1,45	1,42 ± 0,12	98	2,39	

(Continúa en la página siguiente)

Tabla IV.2.4 (Continuación).

Pico	LMR (mg/kg) ^a	Matriz	Añadida (mg/L) ^b	Encontrada (mg/L) ^c	Recuperación (%) ^d	t	LOD (mg/L) ^e
(8)	0,5	Vino blanco	0,21	0,21 ± 0,02	100	0,00	0,063
			0,50	0,52 ± 0,03	104	0,49	
		Vino rosado	0,21	0,24 ± 0,03	114	0,71	0,067
			0,50	0,53 ± 0,03	106	2,43	
		Vino tinto	0,20	0,20 ± 0,05	100	0,00	0,049
			0,60	0,60 ± 0,04	100	0,00	
			1,00	0,97 ± 0,09	97	2,37	
(9)	0,3	Vino blanco	0,18	0,19 ± 0,01	106	0,82	0,092
			0,43	0,39 ± 0,03	91	1,78	
		Vino rosado	0,18	0,16 ± 0,02	89	0,36	0,055
			0,43	0,47 ± 0,04	109	1,33	
		Vino tinto	0,40	0,42 ± 0,09	105	1,54	0,110
			0,70	0,70 ± 0,06	100	0,00	
			1,00	1,00 ± 0,11	100	0,00	
(10)	0,2	Vino blanco	0,18	0,19 ± 0,01	106	0,27	0,054
			0,43	0,40 ± 0,03	93	0,58	
		Vino rosado	0,18	0,17 ± 0,01	94	2,70	0,061
			0,43	0,42 ± 0,02	98	2,52	
		Vino tinto	0,20	0,19 ± 0,04	94	0,98	0,063
			0,60	0,59 ± 0,09	99	0,96	
			1,00	1,01 ± 0,08	101	0,66	
(11)	0,2	Vino blanco	0,22	0,23 ± 0,01	105	0,54	0,063
			0,44	0,41 ± 0,02	93	0,77	
		Vino rosado	0,22	0,20 ± 0,02	91	0,13	0,062
			0,44	0,47 ± 0,03	107	1,34	
		Vino tinto	0,30	0,27 ± 0,06	90	1,49	0,099
			0,65	0,66 ± 0,06	101	0,54	
			1,00	1,01 ± 0,07	101	1,16	
(12)	2	Vino blanco	0,60	0,56 ± 0,09	93	0,80	0,112
			1,20	1,21 ± 0,08	101	0,22	
		Vino rosado	1,33	1,31 ± 0,03	98	0,10	0,398
			2,00	2,11 ± 0,12	106	3,16	
		Vino tinto	1,00	0,95 ± 0,10	95	0,46	0,298
			1,56	1,51 ± 0,13	97	0,36	
			2,12	2,14 ± 0,15	101	1,15	

^a Según datos del MAPA en el momento de la realización de este estudio (2007); ^b Concentración añadida; ^c Concentración encontrada: valor medio ± desviación estándar de cinco determinaciones (3 en vinos rosados) a un nivel de confianza del 95%; ^d Porcentaje de recuperación aparente; ^e LODs del método SPME-REPSM-MEKC-DAD. Identificación: ver Figura IV.2.1.

En dicha tabla también pueden observarse los porcentajes de recuperación aparentes que, en todos los casos, estuvieron comprendidos entre el 88% y el 115%. El término recuperación aparente no se refiere al porcentaje real de extracción de los analitos, sino a la relación entre la concentración determinada tras aplicar el procedimiento SPME-REPSM-MEKC-DAD (“concentración encontrada”) y la concentración añadida, sin que esto implique necesariamente un 100% de extracción que, por otro lado, no suele ser frecuente en SPME (Rodríguez y col., 2003), ya que la extracción no se realiza en condiciones de equilibrio. Este término se utiliza frecuentemente al aplicar el procedimiento de SPME (Navalón y col., 2002; Cai y col., 2006).

La Figura IV.2.6 muestra los electroferogramas obtenidos tras aplicar el método desarrollado a una muestra de vino rosado enriquecida (A) y no enriquecida (B). Puede observarse que, al igual que en las muestras de vino blanco, se pudieron detectar y cuantificar diez plaguicidas sin interferencias aparentes.

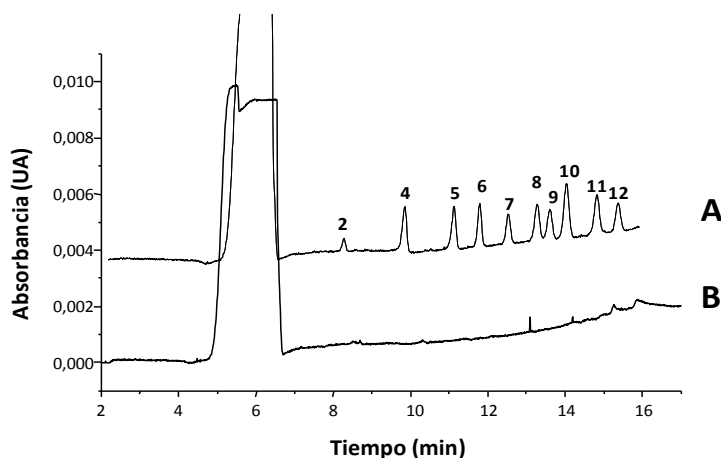


Figura IV.2.6 Electroferogramas obtenidos tras la extracción de una muestra de vino rosado enriquecida (A) y sin enriquecer (B) siguiendo el procedimiento SPME-REPSM-MEKC-DAD propuesto. Muestra: (2) pirimicab (8,94 mg/L), (4) pirimetanil (1,00 mg/L), (5) procimidona (0,29 mg/L), (6) nuarimol (1,41 mg/L), (7) azoxistrobin (0,46 mg/L), (8) tebufenocida (0,60 mg/L), (9) fenarimol (0,50 mg/L), (10) benalaxil (0,75 mg/L), (11) penconazol (0,76 mg/L) y (12) tetradifón (2,40 mg/L). Restantes condiciones experimentales: ver Figuras IV.1.9 y IV.2.5.

Por otro lado, los LODs del método oscilaron entre 0,054 y 0,113 mg/L para el vino blanco, entre 0,040 y 0,929 mg/L para el vino rosado y entre 0,049 y 1,69

mg/L para el vino tinto. En general, estos valores fueron inferiores a los LMRs establecidos por la legislación española para uvas de vinificación (ver Tabla IV.2.4), excepto en el caso del pirimicarb en vino rosado y tinto (0,929 y 1,69 mg/L, respectivamente), cuyo LMR en España es 0,5 mg/kg. Para corroborar estos datos, se realizaron extracciones de muestras de vino enriquecidas con los plaguicidas a niveles de sus LODs correspondientes, confirmando que, efectivamente, estos compuestos se podían extraer a dichos niveles.

Por tanto, los resultados obtenidos muestran claramente que el método desarrollado puede ser aplicado al análisis de estos plaguicidas a niveles de sus LMRs en diferentes muestras de vino. En la Figura IV.2.7 se pueden observar los electroferogramas obtenidos tras aplicar dicho método a una muestra de vino tinto enriquecida (A) y no enriquecida (B). La Figura IV.2.7B permite apreciar que la muestra analizada no contenía ninguno de los plaguicidas en estudio y que tampoco existía interferencia alguna por parte de la matriz sobre los analitos. Asimismo, se observa que los diez plaguicidas pueden ser detectados en muestras de vino tinto utilizando la metodología desarrollada (Figura IV.2.7A).

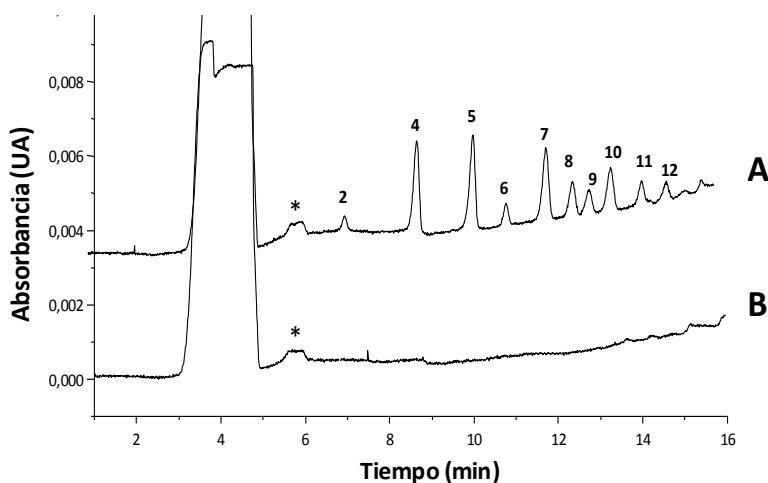


Figura IV.2.7 Electroferogramas obtenidos tras la extracción de una muestra de vino tinto enriquecida (A) y sin enriquecer (B) siguiendo el procedimiento SPME-REPSM-MEKC-DAD propuesto. Muestra: (2) pirimicarb (8,00 mg/L), (4) pirimetanil (1,45 mg/L), (5) procimidona (0,75 mg/L), (6) nuarimol (0,80 mg/L), (7) azoxistrobin (1,45 mg/L), (8) tebufenocida (0,25 mg/L), (9) fenarimol, (10) benalaxil y (11) penconazol (0,60 mg/L) y (12) tetradifón (0,70 mg/L). (*) No identificado. Restantes condiciones experimentales: ver Figuras IV.1.9 y IV.2.5.

IV.2.4 Aplicación del procedimiento de SPME-REPSM-MEKC-DAD a muestras de vino

Con el fin de demostrar la aplicabilidad de la metodología desarrollada y evaluar el contenido de estos plaguicidas en vinos, se analizaron 39 muestras (10 de vino blanco, 9 de vino rosado y 20 de vino tinto). De ellas, 35 fueron vinos elaborados artesanalmente en las Islas Canarias, mientras que las 4 muestras restantes fueron vinos comerciales procedentes de La Rioja (una muestra de vino tinto) y Ciudad Real (una muestra de cada tipo de vino). La Tabla IV.2.5 muestra los resultados de estos análisis, que representan los primeros datos de la literatura acerca del contenido de plaguicidas en vinos rosados y tintos de las Islas Canarias. La identificación de los plaguicidas fue confirmada comparando los tiempos de migración, enriqueciendo los extractos con plaguicidas y comparando la pureza espectral de cada pico (espectros de absorción) con los correspondientes estándares. Como puede observarse en la tabla, se encontraron residuos de plaguicidas en la mayor parte de las muestras, fundamentalmente los fungicidas pirimetanil, procimidona y sólo en una muestra azoxistrobin, aunque en todos los casos a niveles inferiores a sus correspondientes LMRs.

En lo que respecta a los vinos blancos analizados, dos de estas muestras procedían de un agricultor de Lanzarote que fue el único en reconocer que había tratado las uvas con dos plaguicidas concretos: el penconazol y el tetradifón. Sin embargo, no se encontró ningún residuo de tales plaguicidas (ni de otros de los estudiados) en estos dos vinos. En cuanto al resto de muestras, en cinco de ellas se encontró un único plaguicida (procimidona) a concentraciones inferiores a 0,78 mg/L (LMR en España: 5 mg/kg) y, en otra muestra, dos plaguicidas (pirimetanil y procimidona) a concentraciones inferiores a 0,39 mg/L (LMR del pirimetanil en España: 5 mg/kg).

En lo que se refiere a las muestras de vino rosado, tres de ellas contenían residuos de pirimetanil y procimidona conjuntamente, mientras que otras dos, únicamente uno de ellos.

Tabla IV.2.5 Resultados de la aplicación del método desarrollado al análisis de muestras de vino.

Matriz	Muestra	Procedencia (Zona)	Año	Plaguicida detectado	Concentración (mg/L)
Vino blanco	1	Lanzarote (Masdache)	2005	-	-
	2	Lanzarote (Masdache)	2006	-	-
	3	Tenerife (Vilaflor)	2006	Procimidona	<LOQ
	4	Tenerife (Tacoronte)	2006	Procimidona	0,78 ± 0,10
	5	Tenerife (Tegueste)	2006	Procimidona	0,34 ± 0,09
	6	Tenerife (Tacoronte)	2006	Procimidona	<LOQ
	7	Tenerife (Güímar)	2006	-	-
	8	Tenerife (La Orotava)	2006	Procimidona	0,40 ± 0,09
	9	Tenerife (La Guancha)	2006	Pirimetanil Procimidona	0,39 ± 0,09 0,32 ± 0,08
	10*	Ciudad Real (Valdepeñas)	2006	-	-
Vino rosado	1	Lanzarote (Masdache)	2006	-	-
	2	Tenerife (Arico)	2006	-	-
	3	Tenerife (Tacoronte)	2006	-	-
	4	Tenerife (Tacoronte)	2006	Procimidona	0,29 ± 0,09
	5	Tenerife (Los Realejos)	2006	Pirimetanil	0,52 ± 0,12
	6	Tenerife (La Orotava)	2006	Pirimetanil Procimidona	0,70 ± 0,11 0,56 ± 0,09
	7	Tenerife (La Orotava)	2006	Pirimetanil Procimidona	0,60 ± 0,12 0,28 ± 0,09
	8	Tenerife (La Guancha)	2006	Pirimetanil Procimidona	0,47 ± 0,13 0,16 ± 0,10
	9*	Ciudad Real (Valdepeñas)	2006	-	-
Vino tinto	1	Lanzarote (Masdache)	2007	-	-
	2	La Palma (Fuencaliente)	2006	Azoxistrobin	<LOQ
	3	Tenerife (Arico)	2006	-	-
	4	Tenerife (Tacoronte)	2006	Procimidona	<LOQ
	5	Tenerife (Tacoronte)	2006	-	-
	6	Tenerife (Tacoronte)	2006	Pirimetanil Procimidona	<LOQ <LOQ
	7	Tenerife (Tacoronte)	2006	Procimidona	<LOQ
	8	Tenerife (Tacoronte)	2004	-	-
	9	Tenerife (Tacoronte)	2005	-	-
	10	Tenerife (Tegueste)	2006	Pirimetanil Procimidona	<LOQ <LOQ
	11	Tenerife (Tacoronte)	2006	Procimidona	<LOQ
	12	Tenerife (Güímar)	2006	Pirimetanil Procimidona	<LOQ <LOQ
	13	Tenerife (La Orotava)	2006	Pirimetanil Procimidona	<LOQ <LOQ
	14	Tenerife (La Orotava)	2006	Pirimetanil Procimidona	1,18 ± 0,18 0,72 ± 0,10
	15	Tenerife (La Orotava)	2006	Pirimetanil Procimidona	<LOQ <LOQ
	16	Tenerife (La Guancha)	2006	Pirimetanil Procimidona	<LOQ 0,36 ± 0,09
	17	Tenerife (La Guancha)	2006	Procimidona	<LOQ
	18	Tenerife (Icod)	2006	Procimidona	<LOQ
	19*	La Rioja (Haro)	2003	-	-
	20*	Ciudad Real (Valdepeñas)	2006	-	-

* Muestra de vino comercial.

En todos los casos, las concentraciones de los plaguicidas encontrados estuvieron comprendidas entre 0,16 y 0,70 mg/L, niveles claramente inferiores a sus correspondientes LMRs permitidos en uvas de vinificación (5 mg/kg para ambos plaguicidas).

En la Figura IV.2.8 se presenta el electroferograma de una muestra de vino rosado (muestra nº 6), que contenía pirimetanil y procimidona. El correspondiente electroferograma muestra claramente la presencia de estos dos compuestos que son perfectamente cuantificables sin ninguna interferencia de la matriz. Aunque ambos plaguicidas aparecían en algunas otras muestras, su concentración fue siempre inferior a los LMRs permitidos en uvas de vinificación.

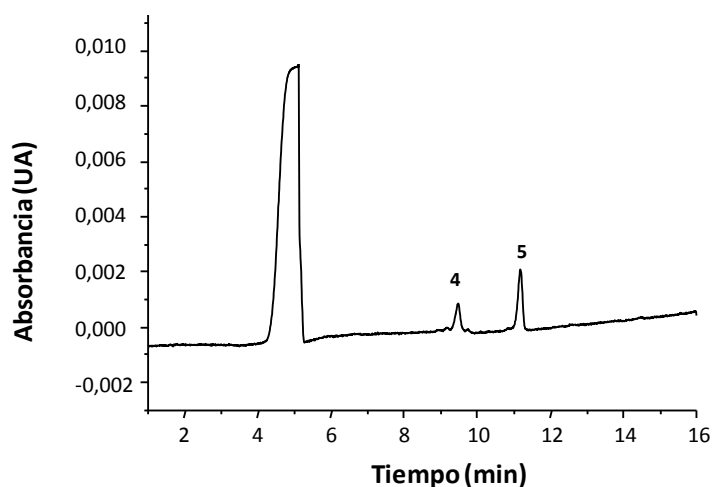


Figura IV.2.8 Electroferograma de una muestra de vino rosado (muestra nº 6) tras aplicar el procedimiento SPME-REPSM-MEKC-DAD optimizado. Identificación: (4) pirimetanil y (5) procimidona.

En las muestras de vino tinto analizadas, se encontraron residuos de tres fungicidas (pirimetanil, procimidona y azoxistrobin), aunque en la mayor parte de los casos a concentraciones inferiores a sus correspondientes LOQs (y en todos los casos sin sobrepasar sus LMRs). De hecho, el fungicida pirimetanil se encontró en seis de las muestras, en cinco casos a concentraciones por debajo del LOQ del método. En una de las muestras se encontró también el plaguicida azoxistrobin a una concentración por debajo del LOQ. Sin embargo, el fungicida procimidona se encontró en doce muestras, en diez casos por debajo del LOQ. La concentración

más alta de estos fungicidas se obtuvo en la muestra nº 14, con 1,18 mg/L de pirimetanil y 0,72 mg/L de procimidona.

Los resultados de este estudio también mostraron que el contenido de plaguicidas encontrados en vinos tintos fue menor que en vinos blancos y rosados. Este hecho se podría asociar al proceso de fabricación de los vinos tintos que es, en general, más complejo y más largo que el de los vinos rosados y blancos. Además, el hecho de que aparezcan residuos de plaguicidas en vinos, aún dos años después de su fabricación, puede justificarse no sólo por el alto contenido de plaguicidas en la materia prima, sino por el hecho de que en general, los plaguicidas son más estables a valores de pH bajos (Jiménez y col. 2007), como es el caso de los vinos (pHs entre 2,9 y 4,2), de ahí que hayan experimentado una degradación más lenta. También se observó que los plaguicidas encontrados mayoritariamente en las muestras analizadas (pirimetanil y procimidona) eran fungicidas de uso muy frecuente en las Islas Canarias, especialmente en las zonas más húmedas de las islas, donde los ataques por hongos son mayores, de ahí que la mayor parte de las muestras pertenecientes a la zona norte de las islas mostraran residuos de estos dos compuestos. La presencia de estos residuos en algunas de las muestras se podría justificar por el hecho de que no se respetaran los tiempos de seguridad adecuados o que no se aplicaran las dosis apropiadas.

En general, los niveles encontrados de los plaguicidas estudiados no representan un problema serio para la salud pública ya que, como se ha mencionado, en todos los casos sus concentraciones estuvieron por debajo de los LMRs establecidos en uvas de vinificación. Sin embargo, los resultados obtenidos pueden servir para que los viticultores tengan una mayor precaución en el uso de estos compuestos, respetando convenientemente los tiempos de seguridad y efectuando dosificaciones más adecuadas que eviten la presencia de estas pequeñas cantidades de algunos de los fungicidas utilizados.

IV.2.5 Conclusiones

- Se ha puesto a punto una nueva metodología para la determinación de un grupo de doce plaguicidas, en su mayoría fungicidas, muy utilizados en el tratamiento de la vid (carbendazima, pirimicarb, metalaxil, pirimetanil, procimidona, nuarimol, azoxistrobin, tebufenocida, fenarimol, benalaxil, penconazol y tetradifón) en muestras de vino blanco, rosado y tinto.
- Esta nueva metodología combina el uso de la MEKC-DAD con técnicas de preconcentración en línea (REPSM) y fuera de línea (SPME).
- El procedimiento de SPME se optimizó por medio de un diseño experimental. Las condiciones óptimas de extracción fueron las siguientes: fibra de PDMS/DVB, 10 mL de muestra con un 30% (p/v) de NaCl, pH 9,5, 143 minutos de extracción a 25°C bajo agitación constante de 900 rpm y 13 minutos de desorción en 1 mL de metanol bajo agitación constante de 1000 rpm. El procedimiento de SPME optimizado permitió la extracción selectiva de diez de los doce plaguicidas, ya que ni carbendazima ni metalaxil pudieron ser extraídos de las muestras de vino, aunque sí de muestras acuoetanólicas.
- La comparación de las rectas de calibrado de las diferentes muestras de vino (calibrado con la matriz de la muestra) con las de disoluciones hidroalcohólicas (agua Milli-Q a pH 9,5 con un 12% v/v de etanol) mostró la existencia de un efecto matriz importante para la mayor parte de los plaguicidas en los tres tipos de vino. Por consiguiente, fue necesario realizar un calibrado específico para cada tipo de vino (calibrado con la matriz).
- El método SPME-REPSM-MEKC-DAD optimizado permitió la determinación de estos plaguicidas en vinos con LODs entre 0,054 y 0,113 mg/L para vinos blancos, entre 0,040 y 0,929 mg/L para vinos rosados y entre 0,049 y 1,69 mg/L para vinos tintos. Se trata de niveles inferiores a los correspondientes LMRs establecidos para uvas de vinificación.

- La validación del método analítico desarrollado mostró que presenta una buena precisión, exactitud, selectividad y linealidad en el intervalo de concentración estudiado, por lo que se puede utilizar de forma fiable para el análisis rutinario de plaguicidas en muestras de vino.
- La aplicación del método desarrollado al análisis de 39 muestras de vino (10 blancos, 9 rosados y 20 tintos), de las cuales 35 fueron vinos elaborados en las Islas Canarias, mostró la presencia de residuos de plaguicidas, fundamentalmente pirimetanil y procimidona y sólo en una muestra azoxistrobin, en 24 de las muestras analizadas (6 blancos, 5 rosados y 13 tintos), aunque en todos los casos en niveles inferiores a los correspondientes LMRs permitidos en uvas de vinificación.

IV.3 Determinación de plaguicidas en tomates por electroforesis capilar con detección DAD combinada con la microextracción en fase sólida y *stacking*.

En la presente sección se describe la determinación de un grupo de siete plaguicidas de entre los estudiados anteriormente (seis fungicidas, pirimetanil, procimidona, nuarimol, fenarimol, benalaxil y penconazol y un insecticida, pirimicarb) en tomates haciendo uso de la SPME y posterior separación y detección por MEKC-DAD. Al igual que en las dos secciones anteriores, se utilizó el REPSM para la preconcentración de los analitos en el propio capilar. También se investigó el uso de la SPE para la extracción y preconcentración de los siete plaguicidas de extractos de tomate, aunque los resultados obtenidos no fueron satisfactorios. Los LODs obtenidos tras aplicar el procedimiento SPME-REPMS-MEKC-DAD desarrollado mostraron que dicho método podía ser utilizado para su determinación en tomates a concentraciones inferiores a los LMRs establecidos por las legislaciones española y europea vigentes. El método estudiado fue aplicado al análisis de doce muestras de tomate comerciales, procedentes de cultivos regionales tanto ecológicos como no ecológicos.

IV.3.1 Antecedentes

El tomate es una de las hortalizas más comercializadas a nivel mundial, siendo apreciada fundamentalmente por su elevado valor nutritivo. Además, constituye uno de los grupos de vegetales más cultivados en todo el mundo, tanto en invernadero como en campo abierto. Especialmente en este último caso las cosechas de tomates son cada vez menos resistentes a enfermedades, como muestran los procesos de selección que se realizan con objeto de mejorar la productividad y calidad de este vegetal (Gualberto y col., 2002; Engindeniz, 2006). Como consecuencia, el uso de plaguicidas, sobre todo fungicidas, en este tipo de cultivos se ha convertido en una práctica agrícola habitual ya que permite mantener un rendimiento elevado de la producción. Sin embargo, la utilización continua e incontrolada de plaguicidas en estos cultivos puede provocar la aparición de residuos en los productos finales.

En Canarias, la importancia del cultivo del tomate es fundamental para su agricultura y economía. De hecho el tomate, principalmente exportado a Gran Bretaña y Holanda (entre el 75 y el 80% del total), constituye la mayor producción agrícola canaria después del plátano.

El análisis de plaguicidas en frutas y verduras se ha llevado a cabo de forma convencional mediante GC y HPLC (Fenoll y col., 2007b). En lo que respecta a la CE, son muy pocos los trabajos que existen en la bibliografía sobre la determinación de plaguicidas en frutas o verduras mediante esta técnica. En todos esos trabajos se hace uso de técnicas de preconcentración en línea y fuera de línea para aumentar la sensibilidad y así alcanzar los niveles legislados (Picó y col., 2003; Kodama y col., 2006). En cuanto a la aplicación de técnicas de preconcentración en línea, se han realizado estudios en frutas y verduras tanto procesadas (bebida de soja, Hernández-Borges y col., 2005d; zumo de frutas, Hernández-Borges y col., 2005a y vino blanco, Molina-Mayo y col., 2007) como no procesadas (uvas y lechuga, Juan-García y col., 2007 y zanahorias, da Silva y col., 2003). En la mayor parte de estos trabajos se han comparado diferentes técnicas de *stacking* y *sweeping* previas a la determinación de los plaguicidas extraídos de dichas matrices.

En cuanto a las técnicas de preconcentración fuera de línea, la SPE ha sido el procedimiento más utilizado en este campo (Rodríguez y col., 2002; Pérez-Ruiz y col., 2005; Juan-García y col., 2005a, 2005b), aunque otras técnicas como la SBSE (Juan-García y col., 2005b), la PLE (Carabias-Martínez y col., 2007) o la SPME (Rodríguez y col., 2003) también se han aplicado con éxito. En la Tabla IV.3.1 se resumen los estudios en los que se ha utilizado esta última técnica. Puede apreciarse que existen pocos trabajos en la bibliografía referentes a la extracción de plaguicidas de frutas y verduras por SPME. Es de destacar, además, que únicamente en 4 de estos estudios se han analizado muestras de tomate (Wennrich y col., 2001; Navalón y col., 2002; Beltrán y col., 2003; Rodríguez y col., 2003) y sólo en una ocasión (Rodríguez y col., 2003) se ha utilizado la SPME en combinación con la CE para la extracción de los plaguicidas *o*-fenilfenol, ioxinil, haloxifop, acifluorfen y pliclorám de extractos de tomate.

Tabla IV.3.1 Aplicaciones de la SPME para la extracción de plaguicidas de frutas y verduras.

Plaguicida	Matriz	Modo de SPME	Tipo de fibra	Técnica analítica	Referencia
7 plaguicidas organofosforados	Pera y zumos de pera, manzana y melocotón	DI	PDMS	GC-NPD	Simplicio y Vilas-Boas, 1999
104 plaguicidas de distintas familias	Melocotón, albaricoque, pomelo y calabacín	DI	PDMS	GC-NPD, ECD y MS	Volante y col., 2000
4 plaguicidas de distintas familias	Fresa	DI	PDMS/DVB	HPLC-DAD	Wang y col., 2000a
11 plaguicidas organoclorados	Fresa, manzana, lechuga y tomate	DI	PDMS/DVB	GC-MS	Wennrich y col., 2001
5 plaguicidas de distintas familias	Fresa	DI	PDMS/DVB	HPLC-DAD	Falqui-Cao y col., 2001
Pirimetanil y metil-kresoxim	Uva, fresa, tomate y ketchup	HS	PA	GC-MS	Navalón y col., 2002
7 plaguicidas organofosforados	Fresa y cereza	HS	PDMS	GC-MS	Lambropoulou y Albanis, 2003
7 piretroides	Tomate y fresa	DI	PDMS/DVB	GC-MS	Beltrán y col., 2003
5 plaguicidas de distintas familias	Cereza, melocotón, naranja y limón	DI	CW/TPR	HPLC-MS/MS	Blasco y col., 2003
5 plaguicidas ácidos	Manzana, naranja, uva y tomate	DI	CW/TPR	CE-MS	Rodríguez y col., 2003
5 plaguicidas organofosforados	Plátano, membrillo, pomelo, manzana, naranja, mandarina, kiwi, limón, melocotón, piña, pera, albaricoque, ciruela, uva, melón, mango, granada, cereza, endrina y coco	HS	PA	GC-NPD	Fytianos y col., 2006
Carbendazima y tiabendazol	Manzana	DI	PDMS/DVB	HPLC-FD	Hu y col., 2008

Con objeto de extender la aplicación de la CE en combinación con la SPME para la determinación de plaguicidas en muestras agroalimentarias, en particular en tomates, se seleccionó un grupo de siete plaguicidas (el insecticida pirimicarb y los fungicidas pirimetanil, procimidona, nuarimol, fenarimol, benalaxil y penconazol), de uso bastante común en Canarias en el período de realización de este estudio. Sin embargo, el Gobierno de España (MAPA) prohibió, a partir de 1 de junio de 2007, el uso en tomate de tres de estos siete plaguicidas (procimidona,

nuarimol y penconazol). Por lo tanto, su seguimiento en muestras comercializadas con técnicas altamente sensibles y selectivas resulta fundamental para asegurar la calidad y el consumo seguro de este tipo de hortaliza, muy consumida por la población por su asociación con propiedades beneficiosas, ya que contiene licopenos y otros carotenoides que actúan como antioxidantes y preventivos de determinados tipos de cáncer, como ya han demostrado diversos autores (Blum y col., 2005; Krinsky y Johnson, 2005; van Breemen y Pajkovic, 2008; Chan y col., 2009). En la Tabla IV.3.2 se muestran los LMRs permitidos en tomate por las legislaciones española y europea en el momento de la realización de este estudio y, también, los recomendados por el *Codex Alimentarius*.

Tabla IV.3.2 LMRs de los plaguicidas de estudio en tomate en el momento de la realización de este estudio (2007).

Plaguicida	LMRs (mg/kg)*		
	Legislación española	Legislación europea	<i>Codex Alimentarius</i>
Pirimicarb	0,5	-	1
Pirimetanil	1	1	-
Procimidona**	2	-	5
Nuarimol**	0,2	-	-
Fenarimol	0,5	0,5	-
Benalaxil	0,2	-	0,5
Penconazol**	0,05	0,1	0,2

* Según datos del MAPA, de la Comisión Europea y del *Codex Alimentarius*.

** Plaguicidas no autorizados en tomate por la legislación española (MAPA).

IV.3.2 Procedimiento de SPE de extractos de tomate

Con objeto de extraer y preconcentrar estos siete plaguicidas de muestras de tomate, inicialmente se llevó a cabo una extracción asistida por ultrasonidos de los analitos con un disolvente orgánico y se aplicó el procedimiento de SPE previo a la determinación electroforética optimizada en la sección IV.1. La influencia del disolvente orgánico en la extracción por ultrasonidos se evaluó empleando diferentes volúmenes, comprendidos entre 5 y 10 mL, de acetona, acetonitrilo, metanol y acetato de etilo, ya que éstos se encuentran entre los disolventes más comunes para la extracción de dichos plaguicidas de frutas y verduras

(Anastassiades y col., 2003). Todas las extracciones se realizaron por duplicado. Para cada experiencia se tomaron 5 g de tomate ecológico previamente homogeneizado y enriquecido a una concentración de 0,3 mg/kg y se colocaron en un baño de ultrasonidos durante 15 minutos con el correspondiente disolvente. A continuación, se centrifugó la mezcla a 4000 rpm durante 5 minutos y se filtró el sobrenadante con filtros de 0,22 μm (Millex-GV₁₃, Millipore). El extracto resultante se evaporó hasta sequedad en rotavapor a 45°C (a 500, 205, 250 y 220 mbar para acetona, acetonitrilo, metanol y acetato de etilo, respectivamente) y el residuo se disolvió en 10 mL de agua Milli-Q. Posteriormente, se ajustó el pH de esta disolución a 3,3 con HCl 1,0 M y se aplicó el procedimiento de SPE descrito para aguas en la sección IV.1 (activación del cartucho Oasis[®] HLB con 15 mL de metanol y 10 mL de agua Milli-Q, secado a vacío de -10 mmHg durante 25 minutos, elución con 2 mL de una disolución 1:1 (v/v) metanol:diclorometano y 5 mL de diclorometano, evaporación en rotavapor a 40°C y 500 mbar y reconstitución en 1 mL de una disolución 1:3 (v/v) agua:tetraborato sódico 100 mM a pH 8,5).

En estos estudios preliminares se pudo comprobar que en ninguna de las condiciones experimentales ensayadas se podían extraer selectivamente los analitos de interés, ya que siempre existían importantes interferencias por parte de la matriz de la muestra, por lo que la identificación y cuantificación de los analitos no fue posible bajo estas condiciones de extracción. A modo de ejemplo, la Figura IV.3.1 muestra los electroferogramas de una muestra de tomate enriquecida tras aplicar el procedimiento SPE-REPSM-MEKC-DAD al extracto de metanol (Figura IV.3.1A) y de acetona (Figura IV.3.1B) previamente evaporados. Como puede observarse, existe un fuerte efecto matriz de la muestra que impide la correcta identificación y cuantificación de los analitos. El empleo de acetonitrilo como disolvente de extracción dio lugar a resultados similares. Sin embargo, al utilizar acetato de etilo, no se pudo aplicar la técnica de REPSM, como consecuencia de las caídas de corriente generadas continuamente.

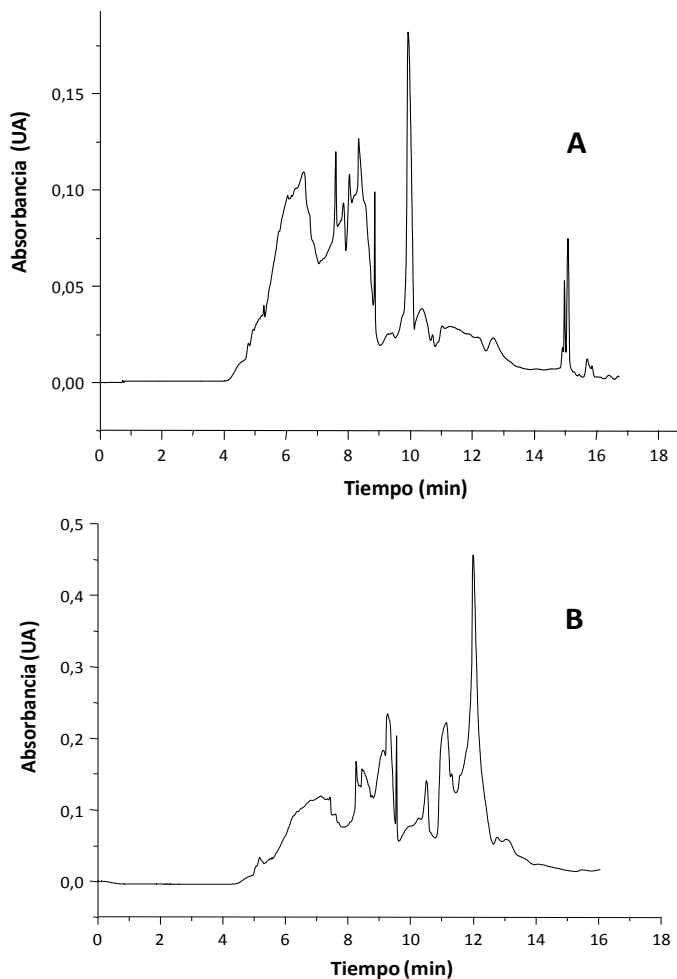


Figura IV.3.1 Electroferogramas obtenidos tras la extracción de una muestra de tomate enriquecida (0,3 mg/kg de cada plaguicida) siguiendo el procedimiento SPE-REPSM-MEKC-DAD descrito, utilizando 5 mL de metanol (A) y acetona (B) como disolventes de extracción. Muestra disuelta en 1:3 (v/v) agua:tetraborato sódico 100 mM a pH 8,5. Restantes condiciones experimentales: ver Figura IV.1.9.

IV.3.3 Procedimiento de SPME de extractos de tomate

Debido a que el uso de la SPE como técnica de preconcentración fuera de línea no permitió obtener electroferogramas con los que poder identificar y cuantificar correctamente los plaguicidas, se decidió aplicar el procedimiento de SPME optimizado en la sección IV.2 (activación de la fibra de PDMS/DVB con metanol bajo agitación a 500 rpm durante 30 minutos, extracción de 10 mL de muestra a pH 9,5 con un 30% (p/v) de NaCl durante 143 minutos a 900 rpm,

desorción con 1,0 mL de metanol durante 13 minutos a 1000 rpm, evaporación en rotavapor a 40°C y 250 mbar y reconstitución en 1,0 mL de una disolución 1:3 (v/v) agua:tetraborato sódico 100 mM a pH 8,5), basado en la capacidad de extracción de las fibras de PDMS/DVB, dado que proporcionaron una selectividad elevada y una adecuada extracción de los analitos sin interferencias de la matriz. Teniendo en cuenta que todos los plaguicidas del presente estudio fueron utilizados en la sección anterior, inicialmente se decidió aplicar dicho procedimiento de SPME en las muestras de tomate, tras la extracción de los analitos con un disolvente orgánico adecuado. Con este propósito, se llevaron a cabo diferentes extracciones de 5 g de tomate ecológico previamente homogeneizado y enriquecido (0,8 mg/kg de cada analito) y diferentes volúmenes, entre 3 y 10 mL, de acetonitrilo, acetona y acetato de etilo, realizando cada extracción por duplicado y durante un tiempo que osciló entre 5 y 15 minutos en baño de ultrasonidos. A continuación, se centrifugó la mezcla a 4000 rpm durante 5 minutos y se filtró el sobrenadante con filtros de 0,22 μm (Millex-GV₁₃, Millipore). Tras la evaporación hasta sequedad a 45°C en rotavapor y reconstitución de los extractos con 10 mL de agua Milli-Q, se ajustó el pH a 9,5 con NaOH 1,0 M y se aplicó el procedimiento de SPME descrito anteriormente.

Pudo comprobarse que, en todos los casos, los siete plaguicidas podían ser extraídos de las muestras de tomate sin impedimentos por caídas de corriente y sin interferencias por parte de la matriz, como mostraron los electroferogramas obtenidos. Sin embargo, no todos los disolventes orgánicos empleados dieron lugar a eficacias de extracción similares, como puede observarse en la Figura IV.3.2 (resultados expresados como área de pico), siendo la acetona la que proporcionó los mejores resultados en términos de capacidad de extracción de los siete analitos de manera simultánea.

También se comprobó que, para la extracción cuantitativa de todos los plaguicidas de 5 g de muestra homogeneizada, eran suficientes 5 mL de acetona (Figura IV.3.3). Cuando se emplearon volúmenes superiores de disolvente orgánico se observó que las eficacias de extracción de los analitos no mejoraban, como se puede apreciar en la Figura IV.3.3. Resultados similares fueron obtenidos al

estudiar la influencia del tiempo de extracción en baño de ultrasonidos, siendo suficientes 5 minutos para una extracción cuantitativa, ya que tiempos superiores no mejoraban las extracciones, por lo que se seleccionaron dichos valores (5 mL de acetona y 5 minutos de extracción) para llevar a cabo las siguientes experiencias.

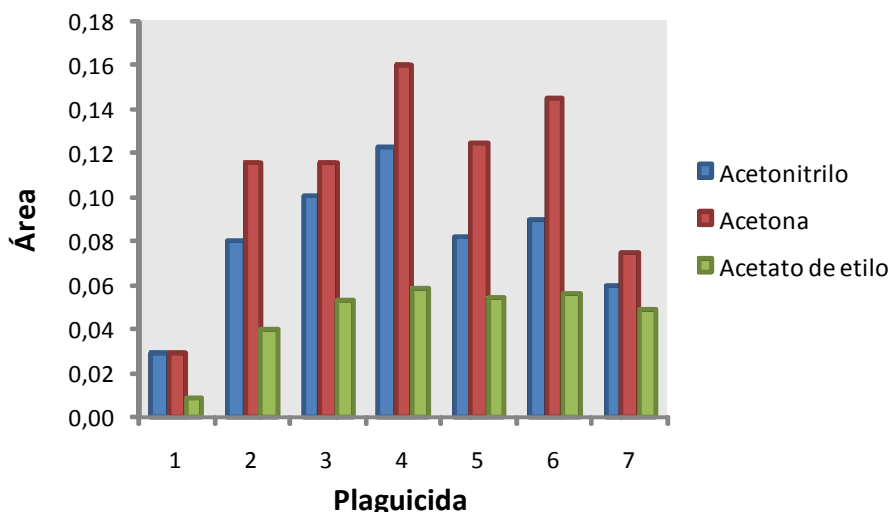


Figura IV.3.2 Influencia del tipo de disolvente orgánico (acetonitrilo, acetona y acetato de etilo) en la extracción de los siete plaguicidas de 5 g de tomate. Extracción asistida por ultrasonidos con 5 mL de disolvente y durante 5 minutos. Procedimiento de SPME: ver Figura IV.2.5. Muestra: 0,8 mg/kg de cada plaguicida. (1) Pirimicarb, (2) pirimetanil, (3) procimidona, (4) nuarimol, (5) fenarimol, (6) benalaxil, (7) penconazol.

En la Figura IV.3.4 pueden observarse los electroferogramas obtenidos tras aplicar el método estudiado a una muestra de tomate enriquecida (Figura IV.3.4A) y no enriquecida (Figura IV.3.4B), tras su extracción con acetona. Como puede apreciarse, los siete plaguicidas podían extraerse de la muestra sin interferencias por parte de la matriz, dando lugar a separaciones con tiempos de análisis próximos a los 16 minutos.

Por tanto, el procedimiento de SPME proporcionó una extracción más cuantitativa y selectiva al compararlo con el procedimiento de SPE aplicado anteriormente, el cual no permitía identificar ni cuantificar los analitos en estudio.

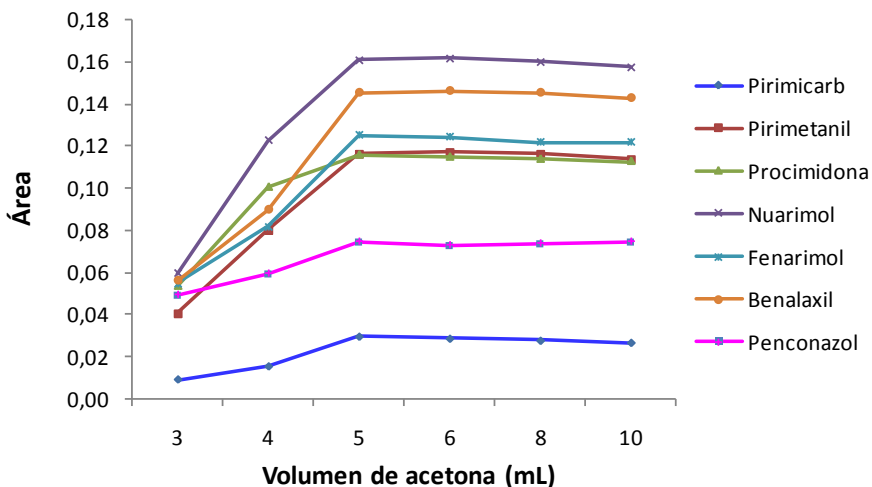


Figura IV.3.3 Influencia del volumen de acetona en la extracción de los siete plaguicidas de 5 g de tomate. Extracción asistida por ultrasonidos con 3, 4, 5, 6, 8 y 10 mL de acetona y durante 5 minutos. Procedimiento de SPME: ver Figura IV.2.5. Muestra: 0,8 mg/kg de cada plaguicida.

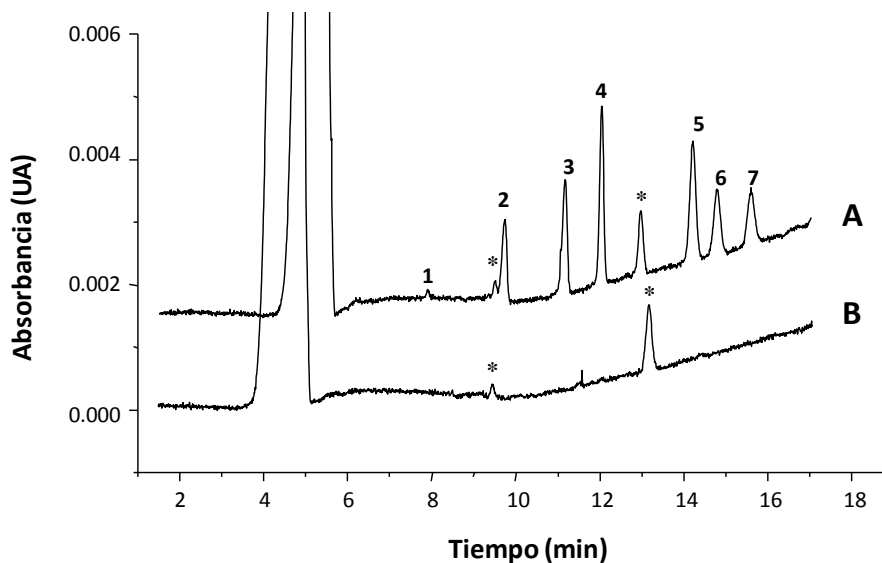


Figura IV.3.4 Electroferogramas obtenidos tras la extracción de una muestra de tomate enriquecida (A) y sin enriquecer (B) siguiendo el procedimiento SPME-REPSM-MEKC-DAD estudiado. Extracción asistida por ultrasonidos con 5 mL de acetona durante 5 minutos. Muestra: todos los plaguicidas a una concentración de 1,20 mg/kg, excepto el fenarimol (1,0 mg/kg) y el benalaxil (0,78 mg/kg). Identificación y restantes condiciones experimentales: ver Figura IV.3.2. (*) No identificado.

IV.3.4 Validación del método

Al igual que sucedía en el caso de los vinos, la matriz de la muestra de tomate presenta una complejidad bastante elevada, de ahí que muchos compuestos puedan interferir en la extracción y preconcentración de los analitos. Por esta razón se estudió el efecto matriz de las muestras de tomate en la calibración, comparando estadísticamente las rectas de calibrado de los extractos de SPME enriquecidos (calibrado con la matriz) con las de los estándares, ambos disueltos en 1:3 (v/v) agua:tetraborato sódico 100 mM a pH 8,5. La Tabla IV.3.3 muestra los resultados del estudio de calibración (basado en áreas de pico) obtenidos a partir de la inyección, por triplicado, de muestras de tomate enriquecidas con los siete plaguicidas a distintos niveles de concentración (n=7). En dicha tabla se pueden observar los rangos de concentración estudiados, los parámetros estadísticos calculados a partir de la regresión de mínimos cuadrados y la evaluación del efecto matriz en cada caso. Como se puede apreciar, para todos los plaguicidas se obtuvo una buena linealidad, con coeficientes de correlación (R) superiores a 0,995 en todos los casos.

Tabla IV.3.3 Datos del calibrado con la matriz y resultados de la evaluación del efecto matriz.

Plaguicida	Rango (mg/L)*	b (S _b)	a (S _a)	R	Efecto matriz**
Pirimicarb	2,50-12,5	0,006 (0,000)	0,004 (0,003)	0,996	Sí
Pirimetaniil	2,10-12,5	0,034 (0,002)	-0,026 (0,012)	0,995	Sí
Procimidona	2,50-12,5	0,035 (0,002)	0,020 (0,015)	0,995	Sí
Nuarimol	1,00-12,5	0,057 (0,001)	-0,000 (0,011)	0,998	Sí
Fenarimol	2,00-10,0	0,057 (0,001)	-0,019 (0,010)	0,998	Sí
Benalaxil	2,50-12,5	0,036 (0,002)	0,145 (0,014)	0,995	Sí
Penconazol	3,30-12,5	0,036 (0,001)	-0,056 (0,010)	0,997	Sí

b: pendiente; S_b: desviación estándar de la pendiente; a: ordenada en el origen; S_a: desviación estándar de la ordenada en el origen, R: coeficiente de correlación.

* Rango de concentración estudiado (mg/L).

** Se considera diferencia estadística cuando los valores *p* de la comparación entre las ordenadas en el origen o entre las pendientes son ≤0,1.

En lo que respecta a la evaluación del efecto matriz, que se realizó haciendo uso del programa *StatGraphics Plus 5.1*, se compararon estadísticamente las pendientes y las ordenadas en el origen para cada plaguicida, observándose en todos los casos diferencias significativas entre ellas (valores p menores o iguales a 0,1, ver Tabla IV.3.3), por lo que existía un fuerte efecto matriz en las muestras de tomate. Esto hizo necesario el desarrollo de una calibración específica para esta matriz (calibrado con la matriz), que se utilizó para cuantificar los plaguicidas en las muestras de tomate.

Una vez estudiado el calibrado con la matriz, se llevaron a cabo los correspondiente estudios de precisión y exactitud del método realizando tres extracciones consecutivas ($n=3$) de las muestras de tomate enriquecidas a dos niveles de concentración (ver Tabla IV.3.4). En dicha tabla se pueden observar los niveles de concentración de cada plaguicida, los LMRs según la legislación española vigente en el momento de la realización de este estudio (año 2007), los LODs del método, así como los resultados del estudio de precisión y exactitud, realizados utilizando una prueba *t-Student* (Miller y Miller, 2002). Como se puede observar en la Tabla IV.3.4, en todos los casos los valores experimentales del estadístico t fueron inferiores al valor tabulado (4,30 para $n=3$), a un nivel de confianza del 95%, con lo que la hipótesis nula se puede aceptar, no observándose diferencias significativas entre el valor real y el experimental.

En dicha tabla también se pueden observar los porcentajes de recuperación aparentes (calculados como la relación entre la concentración encontrada y la concentración añadida), que en todos los casos estuvieron comprendidos entre el 94% y el 102% para todos los plaguicidas. Por otra parte, los LODs del método (valores que fueron verificados mediante la extracción de muestras de tomate enriquecidas a ese nivel), oscilaron entre 0,134 mg/kg (nuarimol) y 0,476 mg/kg (pirimicarb). Como puede observarse en la Tabla IV.3.4, dichos valores fueron, en general, inferiores a los correspondientes LMRs establecidos por la legislación española en tomates, excepto en el caso del penconazol (0,373 mg/kg), cuyo LMR en España es de 0,05 mg/kg. Los resultados obtenidos muestran, por tanto, que el

método estudiado puede ser aplicado al análisis de estas plaguicidas en muestras de tomates a niveles de sus LMRs.

Tabla IV.3.4 Resultados del estudio de precisión y exactitud del método desarrollado para la cuantificación de los siete plaguicidas en muestras de tomate.

Plaguicida	LMR (mg/kg) ^a	Añadida (mg/kg) ^b	Encontrada (mg/kg) ^c	Recuperación (%) ^d	t	LOD (mg/kg) ^e
Pirimicarb	0,5	1,50	1,51 ± 0,13	101	2,48	0,476
		2,00	2,01 ± 0,18	101	1,76	
Pirimetanol	1	1,13	1,13 ± 0,10	100	0,00	0,217
		1,50	1,51 ± 0,12	101	2,46	
Procimidona	2	1,52	1,51 ± 0,10	99	0,66	0,152
		2,00	2,04 ± 0,15	102	1,10	
Nuarimol	0,2	0,78	0,78 ± 0,06	100	0,00	0,134
		1,12	1,14 ± 0,12	102	1,93	
Fenarimol	0,5	0,72	0,71 ± 0,04	99	1,42	0,164
		1,12	1,09 ± 0,09	97	4,04	
Benalaxil	0,2	1,00	1,00 ± 0,11	100	0,00	0,183
		1,50	1,41 ± 0,13	94	3,69	
Penconazol	0,05	1,13	1,10 ± 0,08	97	4,19	0,373
		2,00	1,95 ± 0,12	98	1,07	

^a Según datos del MAPA en el momento de la realización de este estudio (2007); ^b Concentración añadida; ^c Concentración encontrada: valor medio ± desviación estándar de tres determinaciones a un nivel de confianza del 95%; ^d Porcentaje de recuperación aparente; ^e LODs del método SPME-REPSM-MEKC-DAD.

IV.3.5 Aplicación del método de SPME-REPSM-MEKC-DAD al análisis de tomates

Una vez validado el procedimiento desarrollado, se analizó el contenido de los siete plaguicidas en muestras de tomate de distinta procedencia. Para ello, se analizaron doce muestras comerciales seleccionadas, fundamentalmente, de cultivos regionales. De ellas, dos fueron muestras de tomate ecológico, mientras que las diez restantes procedían de cultivos no ecológicos (ver Tabla IV.3.5). Cada determinación se realizó tomando 5 g de muestra provenientes de la homogeneización de 10 tomates (aproximadamente 1 kg), como indica el Real Decreto 290/2003 de 7 de marzo (BOE nº 58 de 8 de marzo de 2003), por el que se establecen los métodos de muestreo para el control de residuos de plaguicidas en productos de origen vegetal y animal.

Tabla IV.3.5 Muestras de tomate analizadas.

Muestra	Tipo de cultivo	Procedencia
1	Ecológico	Tacoronte (Tenerife)
2	Ecológico	Tacoronte (Tenerife)
3	No ecológico	Tacoronte (Tenerife)
4	No ecológico	La Laguna (Tenerife)
5	No ecológico	Tacoronte (Tenerife)
6	No ecológico	Tacoronte (Tenerife)
7	No ecológico	Granadilla de Abona (Tenerife)
8	No ecológico	Península
9	No ecológico	Granadilla de Abona (Tenerife)
10	No ecológico	Granadilla de Abona (Tenerife)
11	No ecológico	Península
12	No ecológico	Granadilla de Abona (Tenerife)

Tras realizar los correspondientes análisis, se observó que en ninguna de las muestras analizadas se encontraron residuos de los siete plaguicidas estudiados. De hecho, en todos los casos se obtuvieron electroferogramas similares al que se presenta en la Figura IV.3.5 (correspondiente a la muestra nº 7), en los que se observaron dos picos de la propia matriz de la muestra que no interferían con los de los plaguicidas de estudio. Además, se encontró que dichos picos eran mayores cuanto mayor era el grado de maduración de la muestra inicial, lo que sugiere su relación con compuestos originados durante la etapa de maduración y no con la presencia de otros plaguicidas en las muestras. Sería interesante caracterizar estos compuestos haciendo uso de un detector de MS.

IV.3.6 Conclusiones

- Se ha puesto a punto una nueva metodología para la determinación de un grupo de siete plaguicidas muy utilizados en el cultivo del tomate (seis fungicidas, pirimetanil, procimidona, nuarimol, fenarimol, benalaxil y penconazol y un insecticida, pirimicarb).
- Esta nueva metodología combina el uso de la MEKC-DAD con técnicas de preconcentración en línea (REPSM) y fuera de línea (SPME).

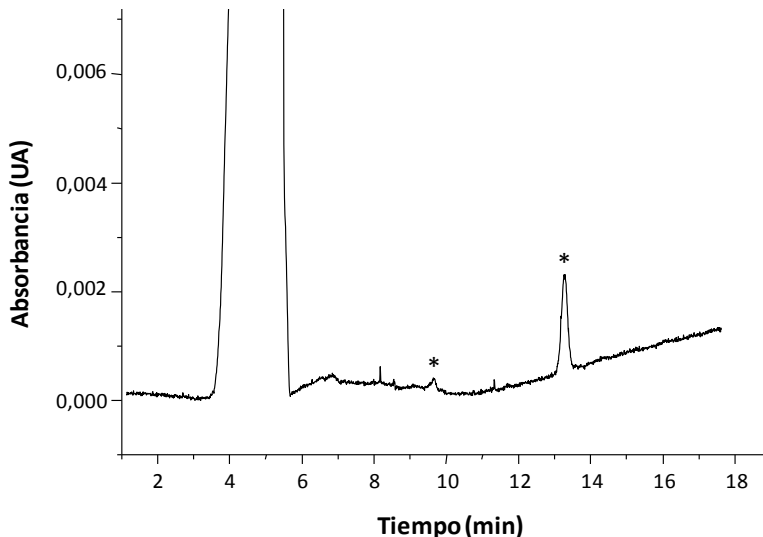


Figura IV.3.5 Electroferograma de una muestra de tomate (muestra nº 7) tras aplicar el procedimiento SPME-REPSM-MEKC-DAD estudiado. (*) No identificado.

- Para la extracción de los siete analitos de las muestras de tomate se estudió un método de extracción asistida por ultrasonidos previo a la aplicación de la SPME, haciendo uso de distintos disolventes orgánicos durante diferentes tiempos de extracción. Las mejores condiciones de extracción resultaron ser: 5 mL de acetona y 5 minutos de extracción.
- Además de la SPME, se estudió el uso de la SPE para la extracción y preconcentración selectiva de los siete plaguicidas de los extractos de tomate, aunque esta última técnica no proporcionó resultados satisfactorios.
- El procedimiento SPME-REPSM-MEKC-DAD estudiado permitió la extracción selectiva de los siete plaguicidas sin interferencias que dificultasen la correcta cuantificación de los mismos.
- La comparación de las rectas de calibrado de la muestra de tomate con las de los estándares disueltos en 1:3 (v/v) agua:tetraborato sódico 100 mM a pH 8,5 mostró la existencia de un efecto matriz importante para todos los plaguicidas, por lo que fue necesario realizar un calibrado específico para las muestras de tomate (calibrado con la matriz).

- Los LODs obtenidos, que oscilaron entre 0,134 mg/kg (nuarimol) y 0,476 mg/kg (pirimicarb), mostraron que el método desarrollado puede utilizarse para la determinación de los siete plaguicidas en tomates a concentraciones inferiores a los LMRs establecidos por la legislación española vigente (excepto en el caso del penconazol).
- La validación del método analítico desarrollado mostró que dicho método presenta una buena precisión, exactitud, selectividad y linealidad en el intervalo de concentraciones estudiado, por lo que se puede utilizar de forma fiable para el análisis de plaguicidas en muestras de tomate.
- La aplicación de este método al análisis de doce muestras de tomate comerciales procedentes de cultivos ecológicos y no ecológicos mostró la ausencia de residuos de los plaguicidas estudiados en dichas muestras. Estos resultados representan los primeros datos de la bibliografía sobre el contenido de plaguicidas de este tipo en tomates de las Islas Canarias.

IV.4 Uso de nanotubos de carbono de pared múltiple como fase estacionaria para la extracción de plaguicidas de aguas y zumos de frutas previamente a su determinación por cromatografía de gases.

En la presente sección se describe la determinación de un grupo de ocho plaguicidas, en su mayoría insecticidas (siete organofosforados, etoprofos, diazinón, metil-clorpirifos, fenitrotión, malatión, clorpirifos, fenamifos y una tiadiazina, buprofezín), en aguas (mineral, subterránea y de escorrentía) y en zumos de frutas (manzana, uva, naranja y piña) haciendo uso de la GC-NPD. La etapa de extracción y preconcentración de la muestra se llevó a cabo utilizando la SPE con MWCNTs como fase estacionaria. La cantidad de MWCNTs, el volumen y el pH de la muestra, así como el volumen y el tipo de disolvente de elución se optimizaron factor a factor. El método SPE-GC-NPD desarrollado permitió la determinación de estos ocho analitos en aguas y zumos a concentraciones inferiores a los correspondientes LMRs establecidos por la legislación europea para aguas y frutas. El método estudiado se aplicó al análisis de seis muestras de agua y doce muestras de zumo de frutas.

IV.4.1 Antecedentes

Los plaguicidas organofosforados constituyen uno de los grupos de plaguicidas más empleados en todo el mundo, principalmente para combatir los ataques de insectos en diversos tipos de cultivos. Estos compuestos presentan una alta toxicidad, especialmente al ser absorbidos por el organismo humano ya que afectan al sistema nervioso por medio de la desactivación de la enzima acetilcolinesterasa, que permite la transmisión de los impulsos nerviosos (Vidair, 2004; Worek y col., 2008). Como resultado de su elevada producción y estabilidad, los organofosforados pueden ser fuente de contaminación de aguas superficiales y subterráneas (ver Capítulo I). También pueden existir residuos de estos compuestos en las frutas y verduras en las que se han aplicado e, incluso, es posible que permanezcan en los alimentos una vez que éstos hayan sido procesados como, por ejemplo, en el caso de los vinos o los zumos de frutas (Zambonin y col., 2004).

Para el análisis de plaguicidas organofosforados en aguas y zumos, tradicionalmente se ha utilizado la GC y HPLC (Zambonin y col., 2004; Berijani y col., 2006; Xiao y col., 2006; Zhao y col., 2006; Fu y col., 2009) conjuntamente con técnicas de preconcentración como la SPME (Tomkins e Ilgner, 2002; Farajzadeh y Hatami, 2004; Yu y col., 2004), la SPE con cartuchos convencionales (Ingelse y col., 2001; Albero y col., 2005), o la MSPD (Albero y col., 2003; Chu y col., 2005), principalmente, debido a la complejidad de las matrices, a las bajas concentraciones en las que se encuentran presentes estos plaguicidas y a los bajos LMRs establecidos por la legislación vigente.

En los últimos años se ha conseguido mejorar la SPE a partir del desarrollo de nuevas fases estacionarias que permiten una retención mucho más selectiva de los analitos. Entre estas nuevas fases estacionarias destacan los CNTs, concretamente, los SWCNTs y los MWCNTs que, como se ha mencionado en el Capítulo I, se han utilizado en Química Analítica no sólo como parte de nuevos sensores de gases, biosensores enzimáticos o en la investigación del ADN (como electrodos modificados), sino también como fases estacionarias para la extracción de diversos contaminantes (dioxinas, clorofenoles, PAHs, etc.), entre ellos los plaguicidas. Sin embargo, hasta ahora, su utilización con este fin ha sido bastante limitada, tal como muestra la Tabla I.3.3. En la mayoría de esos estudios se utilizaron los MWCNTs para la extracción de muestras de agua. De hecho, únicamente en 4 ocasiones se analizaron otro tipo de muestras más complejas, concretamente, extractos de ajo (Du y col., 2008), suelos (Min y col., 2008), aceite de oliva virgen (López-Feria y col., 2009) y lodos de depuradora (Basheer y col., 2006). Además, en todos estos trabajos se utilizaron cantidades de MWCNTs (generalmente de diámetro externo entre 30 y 60 nm) de 0,1 g (Cai y col., 2003; Zhou y col., 2007a; Wang y col., 2007a; Min y col., 2008) o 0,2 g (El-Sheikh y col., 2007, 2008; Biesaga y Pyrzynska, 2006). Únicamente Katsumata y col. (2008) utilizaron pequeñas cantidades (50 mg) de MWCNTs de diámetro externo bajo (entre 3 y 10 nm), aunque en este estudio únicamente se extrajo un plaguicida (diazinón), previamente a su determinación por HPLC-UV.

Con objeto de estudiar y extender la aplicación de los MWCNTs como fases estacionarias de SPE para la extracción y preconcentración de plaguicidas de muestras complejas, se seleccionó un grupo de ocho plaguicidas, en su mayoría insecticidas (siete organofosforados, etoprofos, diazinón, metil-clorpirifos, fenitrotión, malatión, clorpirifos, fenamifos, y una tiadiazina, buprofezín), cuyas estructuras químicas se muestran en la Figura IV.4.1. Fruto de una revisión bibliográfica se pudo comprobar que estos ocho plaguicidas no se habían extraído simultáneamente haciendo uso de los MWCNTs como fases estacionarias de SPE. Únicamente el diazinón (Katsumata y col., 2008) y el fenitrotión (Wang y col., 2007a) se habían extraído de muestras de agua y el malatión (López-Feria y col., 2009) de aceite de oliva virgen.

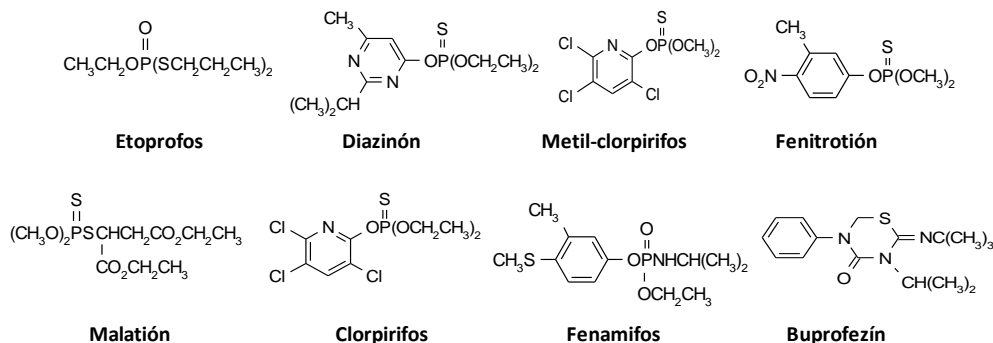


Figura IV.4.1 Estructuras químicas de los ocho plaguicidas estudiados.

IV.4.2 Separación por GC-NPD

Los ocho plaguicidas seleccionados en el presente estudio se utilizan ampliamente para el control de enfermedades relacionadas con ataques de insectos en frutas, vegetales, cereales y flores. En la Tabla IV.4.1 se pueden observar algunas de sus características. Los LMRs que se muestran en la tabla son valores establecidos por la legislación europea en el momento de la realización de este estudio (2008, http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm?event=substance.selection&ch=1). Estos datos pertenecen al nuevo reglamento aplicable desde el 1 de septiembre de 2008 (Reglamento CE nº 396/2005) en materia de LMRs de plaguicidas en todos los productos agrícolas destinados a la alimentación

humana y a piensos animales (ver sección 1.1.5). Este nuevo reglamento comunitario también autoriza el uso en Europa de todos los plaguicidas estudiados en la presente sección, a excepción de malatión, fenitrotión y diazinón, plaguicidas que habían sido previamente excluidos del Anexo I de la Directiva 91/414/CEE. En el caso de malatión y diazinón, la fecha límite de comercialización fue el 6 de junio de 2008, mientras que para el fenitrotión, fue el 25 de mayo de 2008. Además, en todos los casos su utilización no podía extenderse más allá de seis meses desde la fecha límite de comercialización.

Tabla IV.4.1 Características y aplicaciones de los plaguicidas estudiados (*The e-pesticide manual*, 2001).

Plaguicida	Mw (g/mol)	LMR (mg/kg)*	Actividad
Etoprofos	242,3	0,01-0,05	Insecticida/nematicida
Diazinón	304,4	0,01-5	Insecticida
Metil-clorpirifos	322,5	0,01-5	Insecticida
Fenitrotión	277,2	0,01-7	Insecticida
Malatión	330,4	0,02-10	Insecticida/acaricida
Clorpirifos	350,6	0,05-5	Insecticida
Fenamifos	303,4	0,005-0,5	Nematicida
Buprofezín	305,4	0,05-5	Insecticida/acaricida

* Según datos de la Comisión Europea en el momento de la realización de este estudio (2008).

Teniendo en cuenta que los ocho plaguicidas en estudio contienen en su estructura química átomos de nitrógeno y fósforo, se empleó el NPD para su análisis por GC. Además, con el fin de minimizar los errores analíticos se utilizó como estándar interno el trifenil fosfato (TPP), ya que este compuesto ha sido utilizado por otros autores para tal fin en la determinación de plaguicidas organofosforados (Kirchner y col., 2008).

La Figura IV.4.2 muestra el cromatograma de la separación de los ocho plaguicidas por GC-NPD utilizando una columna capilar de sílice fundida Equity™-5 de 30 m x 0,25 mm y 0,25 µm de espesor (ver parte experimental, sección III.2), apropiada para el análisis de plaguicidas organofosforados, con colas de pico relativamente pequeñas que, como se observa en la bibliografía, son muy frecuentes en los análisis de este tipo de compuestos por GC-NPD.

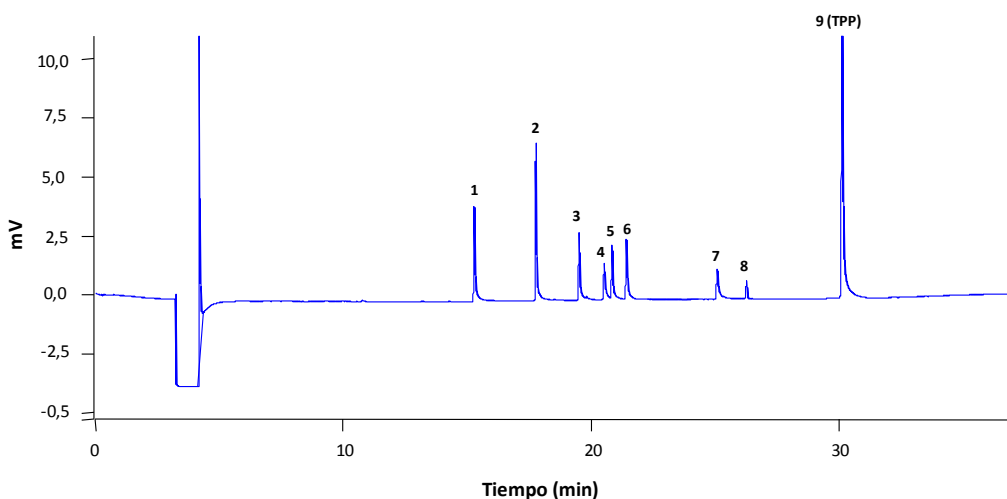


Figura IV.4.2 Cromatograma de la separación por GC-NPD de los ocho plaguicidas en estudio. Columna: Equity™-5 de 30 m x 0,25 mm y 0,25 µm de espesor. Flujos de nitrógeno: 1,0 mL/min (gas portador), 30 mL/min (gas de *make up*). Inyección: 2,0 µL en modo *splitless* a 280°C. Temperatura del NPD: 320°C. Programa de temperatura del horno descrito en la sección III.5. Muestra disuelta en ciclohexano (concentración: 0,3 mg/L de cada plaguicida y 0,64 mg/L de TPP). (1) Etoprofos, (2) diazinón, (3) metil-clorpirifos, (4) fenitrotión, (5) malatión, (6) clorpirifos, (7) fenamifos, (8) buprofezín y (9) TPP.

La Tabla IV.4.2 muestra los resultados del estudio de calibración (basado en áreas de pico) que se llevó a cabo inyectando, por triplicado, seis niveles diferentes de concentración, intervalo entre 0,057 y 1,68 mg/L. Como puede observarse en dicha tabla, se obtuvo una buena linealidad para cada uno de los plaguicidas, con coeficientes de correlación (R) superiores a 0,997 y LODs comprendidos entre 17 µg/L (fenitrotión) y 56 µg/L (buprofezín).

Tabla IV.4.2. Datos de calibrado del método de determinación de los ocho plaguicidas por GC-NPD.

Plaguicida	t _r (min)	Rango (mg/L) ^{a)}	b (S _b)	a (S _a)	R	S _{y/x}	LOD ^{b)} (µg/L)
Etoprofos	15,68	0,073-1,21	2,58 (0,069)	0,050 (0,041)	0,997	0,088	22
Diazinón	18,09	0,103-1,68	2,14 (0,033)	0,052 (0,027)	0,999	0,059	31
Metil-clorpirifos	19,93	0,073-1,59	1,22 (0,013)	-0,003 (0,010)	0,999	0,018	22
Fenitrotión	20,98	0,057-0,95	1,55 (0,033)	-0,023 (0,017)	0,998	0,028	17
Malatión	21,32	0,070-1,31	1,54 (0,009)	-0,056 (0,006)	0,999	0,012	21
Clorpirifos	21,89	0,070-1,19	1,84 (0,008)	-0,001 (0,005)	0,999	0,010	21
Fenamifos	25,97	0,077-1,26	1,69 (0,039)	-0,035 (0,026)	0,998	0,048	23
Buprofezín	26,84	0,187-1,19	0,418 (0,002)	-0,001 (0,001)	0,999	0,002	56

E estándar interno: TPP (t_r: 30,56 min). ^{a)} Rango de concentración estudiado (mg/L). ^{b)} Calculado como tres veces la relación señal/ruido. b: pendiente; S_b: desviación estándar de la pendiente; a: ordenada en el origen; S_a: desviación estándar de la ordenada en el origen; R: coeficiente de correlación (n=6); S_{y/x}: Error estándar de la estimación.

IV.4.3 Optimización del procedimiento de SPE

Con objeto de determinar de forma sensible, selectiva y cuantitativa los ocho analitos de interés en aguas (mineral, subterránea y de escorrentía) y zumos de frutas (manzana, uva, naranja y piña) a los niveles requeridos por la legislación europea, se optimizó un procedimiento de SPE haciendo uso de MWCNTs como fase estacionaria. De acuerdo con la UE, la concentración máxima admisible de plaguicidas en agua potable debe ser de 0,1 µg/L por plaguicida individual y de 0,5 µg/L para la suma de compuestos (ver sección I.1.5). En lo que respecta a los zumos de frutas, hasta el momento la UE no ha establecido LMRs para plaguicidas en este tipo de alimentos procesados, sino únicamente en frutas frescas (ver Tabla IV.4.3), pero se suele tomar estos últimos valores como referencia.

Tabla IV.4.3 LMRs de los plaguicidas de estudio en frutas en el momento de la realización de este estudio (2008).

Plaguicida	Fruta	LMR (mg/kg)*	Plaguicida	Fruta	LMR (mg/kg)*
Etoprofos	Manzana	0,02	Malatión	Manzana	0,01
	Uva	0,02		Uva	0,01
	Naranja	0,02		Naranja	0,01
	Piña	0,02		Piña	0,01
Diazinón	Manzana	0,01	Clorpirifos	Manzana	0,5
	Uva	0,01		Uva	0,5
	Naranja	0,01		Naranja	0,3
	Piña	0,3		Piña	0,05
Metil-clorpirifos	Manzana	0,5	Fenamifos	Manzana	0,02
	Uva	0,2		Uva	0,01
	Naranja	0,5		Naranja	0,02
	Piña	0,05		Piña	0,02
Fenitrotión	Manzana	0,01	Buprofezín	Manzana	0,5
	Uva	0,01		Uva	1
	Naranja	0,01		Naranja	1
	Piña	0,01		Piña	0,5

* Según datos de la Comisión Europea.

Para alcanzar estos niveles, se optimizó la cantidad de fase estacionaria, el volumen y el pH de la muestra, así como el volumen y el tipo de disolvente de elución. Los experimentos iniciales se llevaron a cabo utilizando 100 mL de agua

Milli-Q enriquecida (5 µg/L de cada plaguicida) y 40 mg de MWCNTs de 10-15 nm de diámetro externo, que se acondicionaron previamente con 10 mL de acetonitrilo y 10 mL de agua Milli-Q. Todos los experimentos llevados a cabo durante la optimización, que se describe a continuación, se realizaron por duplicado.

IV.4.3.1 Influencia del tipo y volumen de disolvente de elución

Con el propósito de asegurar una completa elución de todos los analitos, se compararon los resultados obtenidos tras eluir con 20 mL de cinco tipos de disolventes orgánicos de diferente polaridad: diclorometano, ciclohexano, *n*-hexano, acetona y acetonitrilo. Estas extracciones se llevaron a cabo inicialmente a pH 7,0. La Figura IV.4.3 muestra la eficacia de cada disolvente para la elución de los ocho plaguicidas de estudio. De ellos, fue el diclorometano el que dio lugar a mayores porcentajes de recuperación, que resultaron ser superiores al 76% en todos los casos, excepto para el fenamifos, que fue de sólo el 57%. La acetona, por su parte, proporcionó la mayor recuperación para dicho plaguicida (75%) y el ciclohexano, sin embargo, dio lugar a los peores resultados de los cinco disolventes (porcentajes de recuperación entre el 11% y el 54% excepto para el fenamifos, que no pudo ser extraído), debido a su baja polaridad. Por tanto, se utilizó el diclorometano en las siguientes experiencias.

El volumen del disolvente de elución también es un parámetro a tener en cuenta en la optimización del procedimiento de SPE, ya que debe ser suficiente para poder eluir los analitos previamente retenidos por la fase estacionaria. Con este objetivo, se realizaron ensayos con diferentes volúmenes de diclorometano (5, 10, 15, 20 25 y 30 mL). Los resultados obtenidos indicaron que, al utilizar un volumen de 20 mL, los porcentajes de recuperación eran los más altos (por encima del 76% para todos los plaguicidas, excepto para el fenamifos, 57%). Volúmenes mayores de elución dieron lugar a recuperaciones similares, con lo que 20 mL de diclorometano fueron considerados suficientes para una elución cuantitativa de los ocho plaguicidas (ver Figura IV.4.4).

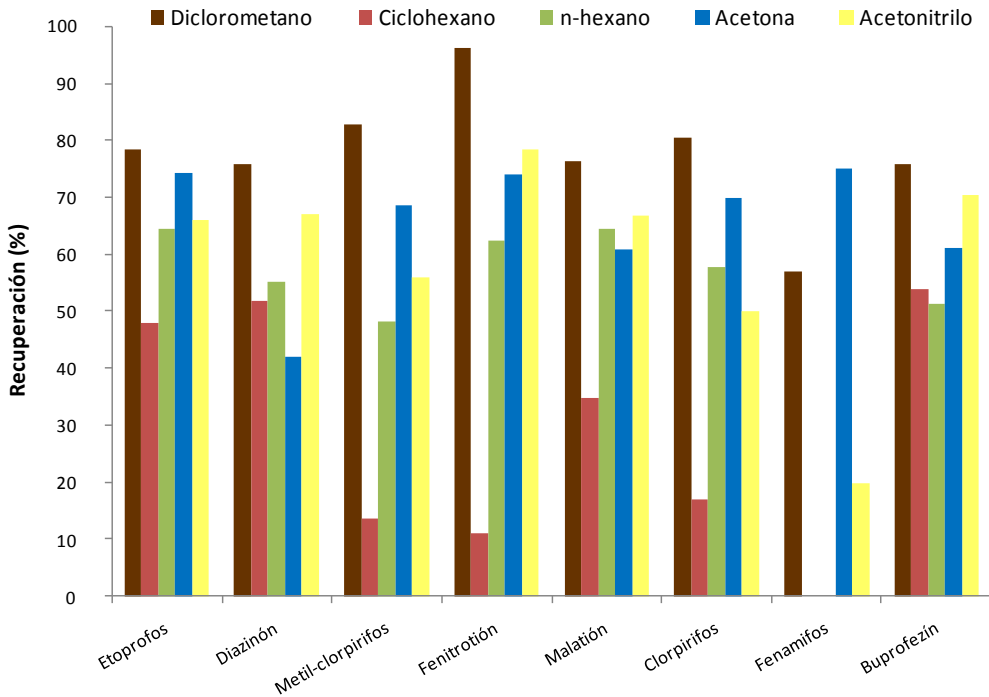


Figura IV.4.3 Influencia del disolvente de elución en la extracción de los ocho plaguicidas en estudio de agua Milli-Q (n=2 en cada caso). Condiciones: 40 mg de MWCNTs, 100 mL de agua Milli-Q enriquecida (5 µg/L de cada plaguicida) a pH 7,0. Volumen de elución: 20 mL. Restantes condiciones experimentales: ver Figura IV.4.2.

IV.4.3.2 Influencia del pH de la muestra

El pH de la muestra también juega un importante papel en el enriquecimiento de los ocho plaguicidas, ya que este parámetro determina el estado de los analitos en la muestra, iones o moléculas neutras, influyendo también en su estabilidad y en la eficacia de la extracción. Con el fin de evaluar la influencia del pH de la muestra, se llevaron a cabo extracciones a valores de pH comprendidos entre 3 y 11, Figura IV.4.5. Se observó que valores entre 3 y 6 proporcionaban porcentajes de recuperación similares (entre el 65 y el 110% para todos los analitos). Por encima de pH 6, se observó una clara disminución de las recuperaciones de todos los plaguicidas, especialmente para malatión y fenamifos que se redujeron hasta el 16 y el 20%, respectivamente, a pH 11 (en general, los plaguicidas son menos estables a valores de pH elevados). Por tanto, se decidió

utilizar un pH de 6 para los siguientes experimentos, ya que daba lugar a porcentajes de recuperación superiores al 65% para todos los plaguicidas.

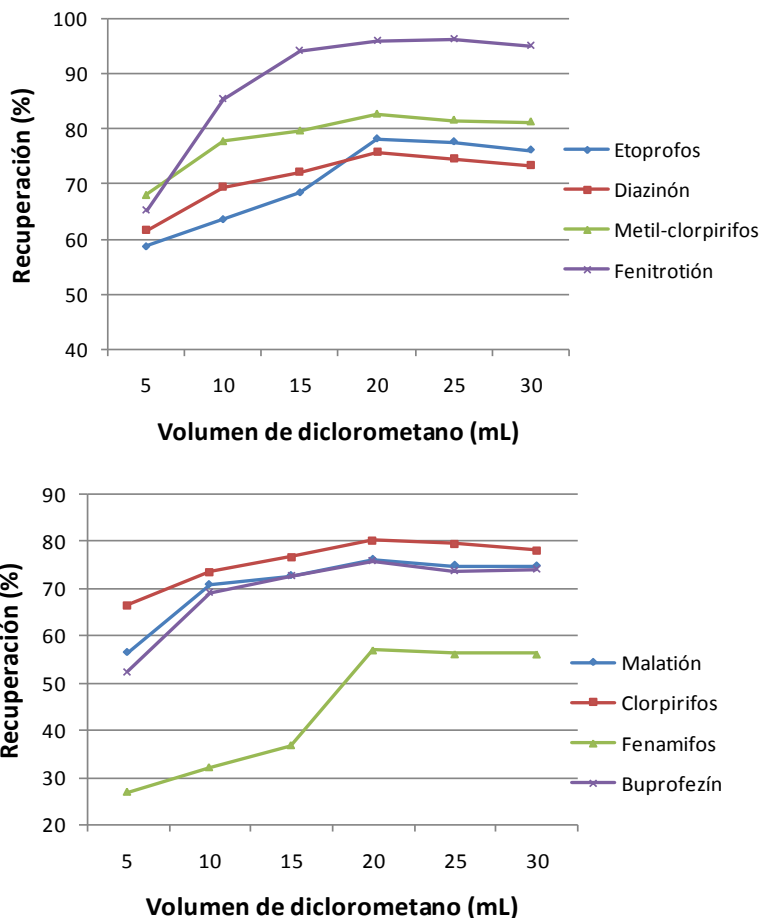


Figura IV.4.4 Influencia del volumen de diclorometano en la extracción de los ocho plaguicidas en estudio de agua Milli-Q (n=2 en cada caso). Condiciones: 40 mg de MWCNTs, 100 mL de agua Milli-Q enriquecida (5 µg/L de cada plaguicida) a pH 7,0. Elución con diclorometano. Restantes condiciones experimentales: ver Figura IV.4.2.

IV.4.3.3 Influencia de la cantidad de MWCNTs y del volumen de muestra

Con el fin de utilizar la menor cantidad de MWCNTs y con ello reducir el costo del procedimiento de SPE, manteniendo a su vez altos porcentajes de recuperación, se estudió la influencia de este parámetro llevando a cabo extracciones con 30, 40, 50 y 100 mg de MWCNTs. Los resultados obtenidos

mostraron que, el uso de 40, 50 y 100 mg de MWCNTs, proporcionaba resultados similares y satisfactorios (porcentajes de recuperación promedio superiores al 65% en todos los casos) mientras que, cantidades menores como 30 mg, daban lugar a recuperaciones bajas, indicando que parte de los analitos no eran retenidos por la fase estacionaria. Por tanto, se utilizaron 40 mg de MWCNTs para llevar a cabo las siguientes experiencias.

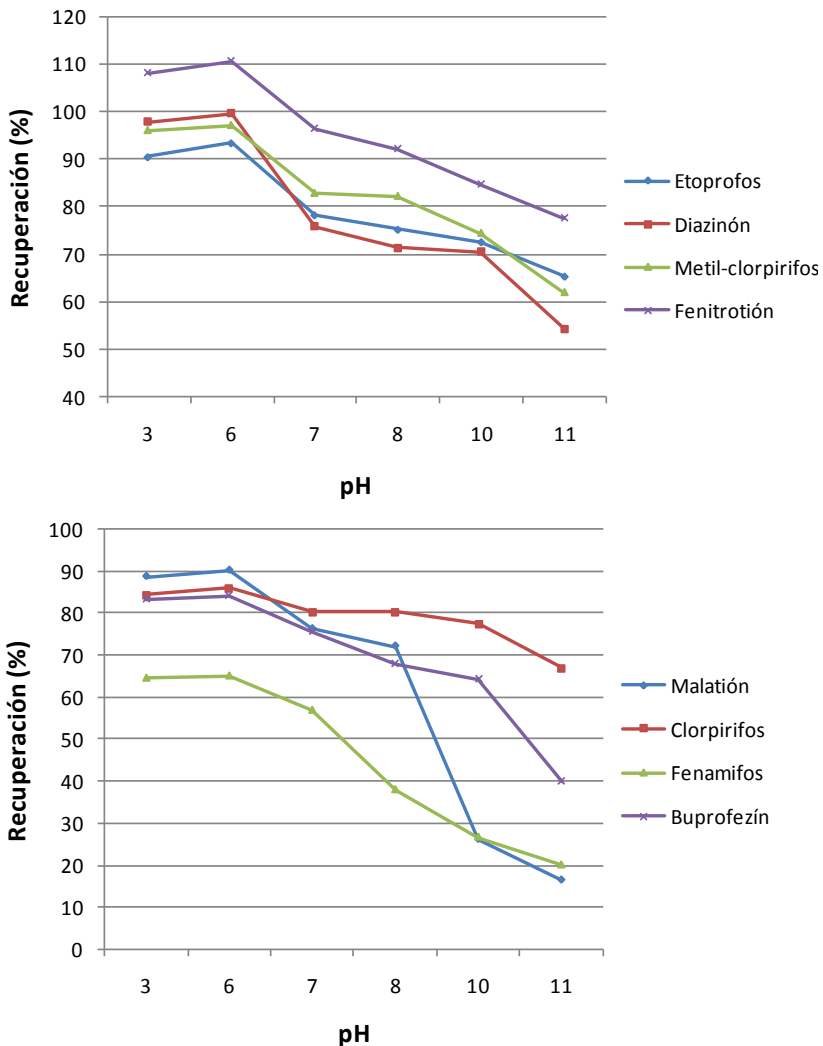


Figura IV.4.5 Influencia del pH de la muestra en la extracción de los ocho plaguicidas en estudio de agua Milli-Q (n=2 en cada caso). Condiciones: 40 mg de MWCNTs, 100 mL de agua Milli-Q enriquecida (5 µg/L de cada plaguicida), elución con 20 mL de diclorometano. Restantes condiciones experimentales: ver Figura IV.4.2.

También se estudió la influencia del volumen de muestra en la adsorción de los ocho plaguicidas, ya que este parámetro permite obtener factores de preconcentración elevados, mejorando así los LODs del método. Para ello, se realizaron ensayos con volúmenes de muestra (agua Milli-Q) comprendidos entre 100 y 800 mL. Los resultados de estos experimentos, que se realizaron por duplicado, mostraron que no existían diferencias significativas en las eficacias de enriquecimiento de los analitos, incluso con volúmenes de 800 mL de muestra haciendo uso únicamente de 40 mg de MWCNTs. Con objeto de evaluar la repetibilidad de este procedimiento, se llevaron a cabo tres extracciones de 800 mL de agua Milli-Q enriquecida con los ocho plaguicidas a una concentración en el intervalo 0,477-0,842 $\mu\text{g/L}$. Los porcentajes de recuperación obtenidos estuvieron comprendidos entre el 83% (buprofezín) y el 114% (fenitrotión), excepto para el fenamifos (64%). Por su parte, los porcentajes de la RSD oscilaron entre el 0,9% (diazinón) y el 8% (fenamifos), valores muy aceptables para un protocolo con SPE.

Por tanto, las mejores condiciones del procedimiento de SPE fueron las siguientes: 40 mg de MWCNTs, 800 mL de muestra a pH 6,0 y 20 mL de diclorometano como disolvente de elución.

IV.4.4 Aplicación del método de SPE-GC-NPD a muestras de agua

El procedimiento de SPE optimizado para agua Milli-Q se aplicó al análisis de tres muestras diferentes de agua (mineral, subterránea y de escorrentía). Se pudo comprobar que era posible aplicar directamente la metodología desarrollada, sin necesidad de diluir ninguna muestra ni introducir ninguna etapa de lavado, dando lugar a porcentajes de recuperación aceptables, que oscilaron entre el 57 y el 116% para los tres tipos de aguas y para todos los plaguicidas, salvo en el caso del fenamifos, que estuvieron comprendidos entre el 40 y el 84%.

IV.4.4.1 Validación del método

Con el fin de validar la metodología desarrollada, se llevaron a cabo los correspondientes estudios de recuperación, tras realizar extracciones de muestras

acuosas no enriquecidas para comprobar la presencia o ausencia de los analitos en ellas. Ninguna de las muestras utilizadas para este estudio de recuperaciones contenía residuos de dichos compuestos ni tampoco presentaban interferencias de matriz que pudieran dificultar la correcta cuantificación de los plaguicidas.

El estudio de recuperaciones se llevó a cabo realizando cinco extracciones consecutivas ($n=5$) de muestras acuosas enriquecidas a tres niveles distintos de concentración. Las recuperaciones promedio se calcularon a partir de la relación entre las áreas de pico de cada plaguicida y el área del estándar interno. La Tabla IV.4.4 muestra los resultados del estudio de recuperaciones para cada nivel en los tres tipos de agua. Como puede observarse, los porcentajes de recuperación promedio oscilaron entre el 75 y 116% para el agua mineral, entre el 67 y el 109% para el agua subterránea y entre el 57 y el 81% para el agua de escorrentía, excepto en el caso del fenamifos, que se encontraban en los rangos 55-84%, 40-67% y 60-67%, respectivamente. Por su parte, los LODs del método alcanzaron niveles de ng/L (ver Tabla IV.4.4), niveles que se encuentran por debajo de los LMRs establecidos por la legislación de la UE para estos compuestos en aguas de consumo humano (0,1 $\mu\text{g/L}$ por plaguicida individual y 0,5 $\mu\text{g/L}$ para la suma de compuestos), a excepción del buprofezín en aguas de escorrentía, cuyo LOD fue ligeramente superior (0,117 $\mu\text{g/L}$). Para el resto de plaguicidas, los LODs estuvieron comprendidos entre 0,018 $\mu\text{g/L}$ (fenitrotión) y 0,041 $\mu\text{g/L}$ (diazinón) en el agua mineral, entre 0,019 $\mu\text{g/L}$ (fenitrotión) y 0,073 $\mu\text{g/L}$ (fenamifos) en el agua subterránea y entre 0,025 $\mu\text{g/L}$ (fenitrotión) y 0,058 $\mu\text{g/L}$ (diazinón) en el agua de escorrentía. También se observó que, en el caso de las aguas de escorrentía, los porcentajes de recuperación promedio eran ligeramente inferiores a los obtenidos tras analizar muestras de agua mineral y subterránea. Esto podría deberse a que la matriz del agua de escorrentía es más compleja que la de las aguas mineral y subterránea, puesto que contiene, entre otros compuestos, una mayor cantidad de materia orgánica (ácidos húmicos y fúlvicos).

Los resultados obtenidos para los ocho analitos son comparables a los publicados anteriormente en la bibliografía sobre la extracción de plaguicidas organofosforados de diferentes muestras de agua haciendo uso de cartuchos de

SPE convencionales como Envi-Carb (Tolosa y col, 1999), Isolute ENV (Planas y col., 2006), RP-C₁₈ (Ballesteros y Parrado, 2004) o discos de SPE que contienen C₁₈ y estireno-DVB (Lambropoulou y col., 2000).

Tabla IV.4.4 Porcentajes de recuperación promedio (n=5), porcentajes de RSD (entre paréntesis) y LODs del procedimiento SPE-GC-NPD en muestras de agua.

Pico	Agua mineral			Agua subterránea			Agua de escorrentía		
	Nivel* (µg/L)	Recuperación y RSD (%)	LOD (µg/L)	Nivel* (µg/L)	Recuperación y RSD (%)	LOD (µg/L)	Nivel* (µg/L)	Recuperación y RSD (%)	LOD (µg/L)
1	0,091	81 (5,1)	0,034	0,091	72 (3,4)	0,038	0,121	64 (3,8)	0,043
	0,242	76 (4,9)		0,303	73 (4,8)		0,303	64 (5,2)	
	0,605	84 (3,4)		0,650	73 (3,2)		0,605	65 (1,9)	
2	0,126	81 (2,7)	0,041	0,126	81 (5,8)	0,047	0,168	66 (2,9)	0,058
	0,337	85 (3,5)		0,421	85 (1,8)		0,421	64 (6,4)	
	0,842	95 (3,0)		0,842	81 (4,0)		0,842	66 (3,2)	
3	0,120	103 (2,0)	0,026	0,120	92 (3,7)	0,030	0,160	69 (1,5)	0,039
	0,320	100 (5,9)		0,400	103 (3,3)		0,400	70 (6,0)	
	0,799	106 (3,8)		0,799	93 (4,3)		0,799	71 (3,5)	
4	0,072	107 (2,5)	0,018	0,072	103 (4,5)	0,019	0,095	66 (3,7)	0,025
	0,191	106 (5,0)		0,239	109 (3,8)		0,239	70 (1,2)	
	0,477	116 (2,9)		0,477	109 (4,2)		0,477	81 (6,5)	
5	0,099	96 (4,4)	0,026	0,099	87 (3,0)	0,032	0,131	64 (2,6)	0,038
	0,263	98 (6,3)		0,328	89 (2,0)		0,328	65 (3,9)	
	0,657	103 (3,3)		0,657	83 (4,7)		0,657	69 (6,9)	
6	0,089	80 (5,4)	0,027	0,089	78 (3,8)	0,031	0,119	70 (2,3)	0,036
	0,238	87 (5,3)		0,298	84 (3,4)		0,298	73 (3,7)	
	0,595	100 (1,4)		0,595	85 (5,5)		0,595	74 (1,1)	
7	0,095	64 (2,0)	0,035	0,095	57 (8,9)	0,073	0,127	60 (8,8)	0,044
	0,235	55 (4,3)		0,317	67 (3,3)		0,317	61 (8,5)	
	0,633	84 (2,0)		0,633	40 (4,9)		0,633	67 (3,6)	
8	0,089	77 (4,9)	0,076	0,089	67 (1,7)	0,102	0,119	57 (4,9)	0,117
	0,238	75 (4,9)		0,298	83 (2,7)		0,298	58 (5,6)	
	0,595	93 (3,7)		0,595	69 (3,7)		0,595	60 (3,7)	

* Nivel de concentración enriquecido. Identificación: ver Figura IV.4.2.

Las recuperaciones del fenitrotión y del diazinón (únicos plaguicidas del grupo de estudio que habían sido previamente extraídos de muestras de agua con MWCNTs) resultaron ser comparables a los que se habían obtenido haciendo uso

de otros MWCNTs para su extracción de muestras de agua de río (Wang y col., 2007a) y de agua de suministro urbano (Katsumata y col., 2008), respectivamente.

IV.4.5 Aplicación del método de SPE-GC-NPD a zumos de frutas

El procedimiento de SPE-GC-NPD optimizado en agua Milli-Q también se aplicó al análisis de zumos de frutas (manzana, naranja, uva y piña). Sin embargo, a pesar de que este procedimiento proporcionó resultados satisfactorios para el análisis de agua mineral, subterránea y de escorrentía (bajo las condiciones de extracción mencionadas anteriormente, sin necesidad de diluir la muestra ni de introducir ninguna etapa de lavado), cuando se aplicó a zumos de frutas fue necesario disminuir el volumen de muestra, tomando en este caso 10 mL. Fruto de estas experiencias iniciales, que también se realizaron por duplicado, se observó que los porcentajes de recuperación promedio oscilaban entre 17 y 95% para los diferentes zumos de frutas, por lo que el procedimiento de SPE descrito no permitía la extracción cuantitativa de estos plaguicidas de este tipo de muestras. Estos valores fueron particularmente bajos para el zumo de piña (entre el 17 y el 47%) y más altos para el zumo de naranja (entre el 53 y el 95%). Además, en el caso de los zumos de piña y de uva no podía extraerse el buprofezín. Como consecuencia, fue necesario llevar a cabo modificaciones en el procedimiento de SPE, concretamente, la dilución de la muestra y la introducción de una etapa de lavado justo antes del secado del cartucho. En particular, se llevaron a cabo diluciones de los cuatro tipos de zumos en las proporciones 1:1, 1:2 y 1:3 (v/v) zumo:agua Milli-Q y protocolos de lavado con diferentes volúmenes de agua Milli-Q (de 1 a 6 mL).

Las Figuras IV.4.6 y IV.4.7 muestran algunos de los resultados obtenidos en estos experimentos. En general, las diluciones de la muestra proporcionaron un importante incremento de las recuperaciones de todos los plaguicidas, especialmente en zumos de manzana y piña. Por otro lado, la introducción de una etapa de lavado también proporcionó un incremento de los porcentajes de recuperación, sobre todo en dichos zumos. Sin embargo, el efecto del lavado solo o combinado con la dilución de las muestras no fue el mismo para cada tipo de zumo.

De hecho, la combinación de una dilución 1:1 (v/v) zumo:agua Milli-Q y un lavado con 6 mL de agua Milli-Q fueron las mejores condiciones para los zumos de uva y piña mientras que, para los zumos de naranja y manzana, fue la combinación de una dilución 1:1 (v/v) zumo:agua Milli-Q y un lavado con 3 mL y 2 mL, respectivamente (ver Figuras IV.4.6 y IV.4.7). Volúmenes mayores a los indicados no mejoraban las recuperaciones e incluso, en algunos casos, se obtenía una disminución de estos valores, debido a la elución parcial de los plaguicidas con el disolvente de lavado. Como se puede apreciar en las Figuras IV.4.6 y IV.4.7, los porcentajes de recuperación obtenidos en los cuatro zumos fueron superiores al 73% para todos los plaguicidas.

El aumento de las recuperaciones de los analitos al diluir la muestra también se había observado en algunos estudios de la bibliografía. A modo de ejemplo, Lambropoulou y Albanis (2002) desarrollaron un procedimiento de HS-SPME seguido de GC-NPD y GC-MS para la determinación de siete insecticidas organofosforados en zumos de fresa y cereza. Entre los distintos parámetros de extracción que consideraron (temperatura, tiempo de extracción, adición de sales, velocidad de agitación, pH, etc.), se encontraba la dilución de la muestra. Se observó que la adición de volúmenes de agua ultrapura mejoraba la recuperación de los analitos de interés, especialmente en el caso del zumo de cereza. Además, los mejores resultados se obtenían al diluir los zumos de fresa y cereza con agua ultrapura hasta alcanzar un 30% y un 50 % (v/v) de agua, respectivamente. Otros autores (Fernández-Álvarez y col., 2008b) estudiaron la influencia de la dilución de una muestra de leche bovina para la extracción de un grupo de 30 plaguicidas de diversas familias por SPME y posterior determinación mediante GC- μ ECD, observando un aumento en la eficacia de extracción al diluir 1 mL de muestra con 9 mL de agua ultrapura, lo que viene a indicar que la dilución de la muestra disminuye el efecto matriz favoreciendo, por tanto, la transferencia de los analitos de la muestra a la fibra.

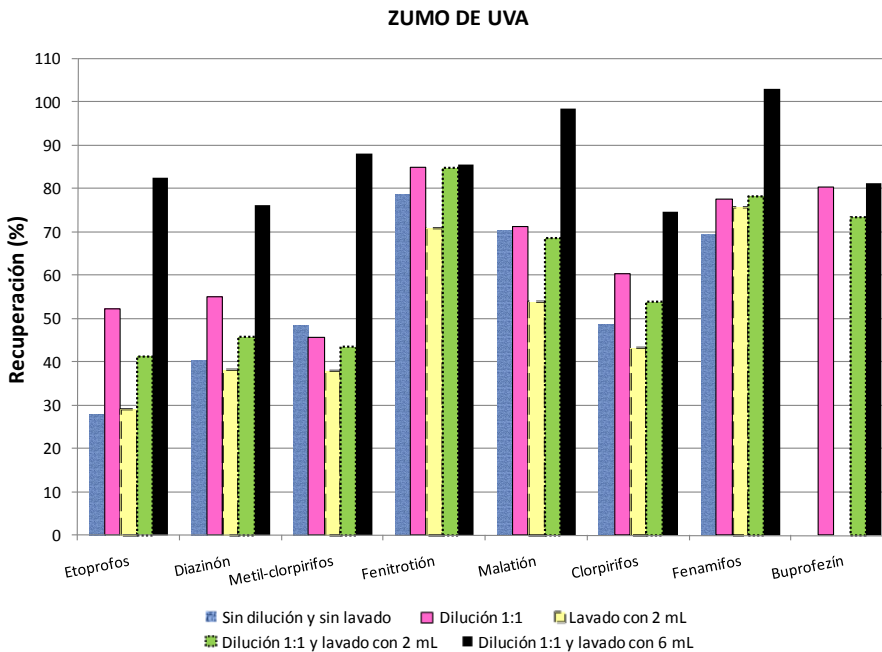
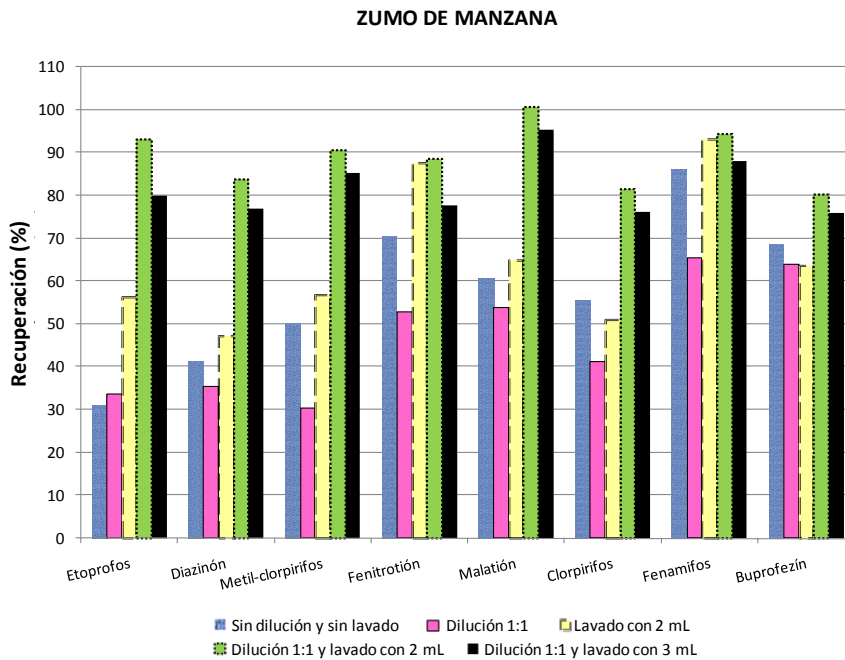


Figura IV.4.6 Influencia de diferentes procedimientos de dilución y lavado en la extracción de los ocho plaguicidas en estudio de zumos de manzana y uva (n=2 en cada caso). Condiciones: 40 mg de MWCNTs, 10 mL de zumo de frutas enriquecido (30 µg/L de cada plaguicida) a pH 6,0. Volumen de elución: 20 mL de diclorometano. Restantes condiciones experimentales: ver Figura IV.4.2.

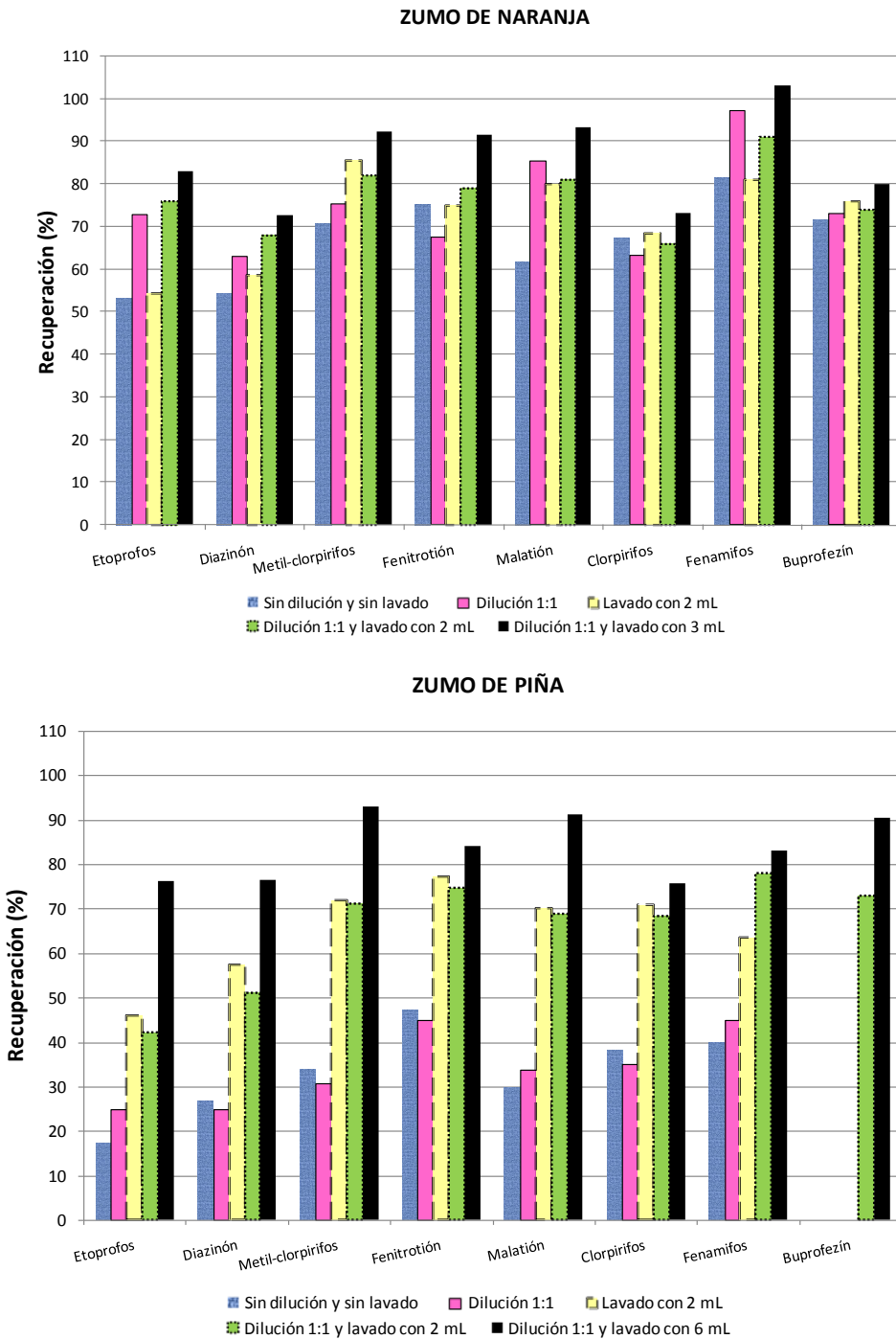


Figura IV.4.7 Influencia de diferentes procedimientos de dilución y lavado en la extracción de los ocho plaguicidas en estudio de zumos de naranja y piña (n=2 en cada caso). Condiciones experimentales: ver Figuras IV.4.2 y IV.4.6.

IV.4.5.1 Validación del método

Con objeto de validar la metodología de SPE-GC-NPD aplicada a zumos de frutas (manzana, uva, naranja y piña), se llevaron a cabo estudios de calibración, de recuperación y de precisión y exactitud, que se describen a continuación.

Un aspecto importante a tener en cuenta cuando se desarrollan métodos analíticos para el estudio de muestras complejas, es la comparación estadística entre las rectas de calibrado obtenidas a partir de los estándares disueltos en disolventes orgánicos (en este caso ciclohexano) y las obtenidas a partir de extractos de muestra enriquecidos, ya que los otros componentes de la muestra pueden aumentar o disminuir la señal cromatográfica, sobre todo en GC (Poole, 2007). Con el propósito de evaluar el efecto matriz de las muestras de zumos, se analizaron los extractos de cada tipo de zumo enriquecidos con los ocho analitos a distintos niveles de concentración ($n=6$), entre 0,057 y 1,68 mg/L. La Tabla IV.4.5 muestra los rangos de concentración estudiados, los parámetros estadísticos de las rectas de calibrado para cada zumo, los coeficientes de correlación (R) y la evaluación del efecto matriz en cada caso. Puede observarse que la respuesta del detector era lineal en el rango de concentraciones estudiado, con coeficientes de correlación superiores a 0,997 para todos los compuestos.

Fruto de la comparación estadística entre las pendientes y las ordenadas en el origen del calibrado con la matriz y de los estándares disueltos en ciclohexano, Tabla IV.4.2, pudo comprobarse que existía un efecto matriz importante para la mayor parte de los analitos en los diferentes zumos. Además es de destacar que, de los cuatro zumos, era el de naranja el que presentaba efecto matriz para mayor número de analitos, concretamente seis (diazinón, metil-clorpirifos, malatión, clorpirifos, fenamifos y buprofezín). Para el zumo de manzana el efecto matriz se observó para etoprofos, diazinón, fenitrotión, malatión y clorpirifos, en el de uva para metil-clorpirifos, fenitrotión, malatión y buprofezín y en el zumo de piña, para diazinón, metil-clorpirifos, clorpirifos y buprofezín. Como resultado, la cuantificación de las muestras se llevó a cabo utilizando las rectas del calibrado con la matriz para tener en cuenta su efecto.

Tabla IV.4.5 Datos de calibración del método SPE-GC-NPD y evaluación del efecto matriz.

Plaguicida	Rango (mg/L)*	Zumo	b (S _b)	a (S _a)	R	Efecto matriz**
Etoprofos	0,073-1,21	Manzana	2,47 (0,052)	0,015 (0,035)	0,999	Sí
		Uva	2,50 (0,039)	0,121 (0,026)	0,999	No
		Naranja	2,67 (0,050)	0,094 (0,034)	0,999	No
		Piña	2,68 (0,092)	0,029 (0,062)	0,997	No
Diazinón	0,103-1,68	Manzana	1,98 (0,039)	0,086 (0,036)	0,999	Sí
		Uva	2,23 (0,055)	-0,006 (0,051)	0,999	No
		Naranja	2,23 (0,044)	0,096 (0,041)	0,999	Sí
		Piña	2,28 (0,061)	0,033 (0,057)	0,998	Sí
Metil-clorpirifos	0,073-1,60	Manzana	1,21 (0,031)	0,001 (0,027)	0,998	No
		Uva	1,16 (0,022)	0,001 (0,020)	0,999	Sí
		Naranja	1,22 (0,031)	0,060 (0,028)	0,998	Sí
		Piña	1,29 (0,018)	-0,029 (0,016)	0,999	Sí
Fenitrotión	0,057-0,954	Manzana	1,38 (0,038)	-0,084 (0,020)	0,998	Sí
		Uva	1,33 (0,021)	-0,049 (0,012)	0,999	Sí
		Naranja	1,46 (0,027)	-0,062 (0,015)	0,999	No
		Piña	1,50 (0,037)	-0,072 (0,019)	0,999	No
Malatión	0,070-1,31	Manzana	1,48 (0,019)	-0,061 (0,014)	0,999	Sí
		Uva	1,49 (0,018)	-0,066 (0,013)	0,999	Sí
		Naranja	1,62 (0,016)	-0,021 (0,012)	0,999	Sí
		Piña	1,57 (0,044)	-0,086 (0,032)	0,998	No
Clorpirifos	0,070-1,19	Manzana	1,74 (0,016)	0,020 (0,011)	0,999	Sí
		Uva	1,90 (0,050)	-0,040 (0,033)	0,998	No
		Naranja	1,78 (0,022)	0,056 (0,014)	0,999	Sí
		Piña	1,97 (0,032)	-0,020 (0,021)	0,999	Sí
Fenamifos	0,077-1,27	Manzana	1,59 (0,045)	-0,123 (0,032)	0,998	No
		Uva	1,59 (0,060)	-0,129 (0,042)	0,997	No
		Naranja	1,56 (0,017)	-0,076 (0,012)	0,999	Sí
		Piña	1,63 (0,056)	-0,111 (0,040)	0,997	No
Buprofezín	0,187-1,19	Manzana	0,420 (0,008)	-0,006 (0,005)	0,999	No
		Uva	0,447 (0,004)	-0,004 (0,003)	0,999	Sí
		Naranja	0,430 (0,010)	0,004 (0,006)	0,999	Sí
		Piña	0,447 (0,012)	-0,011 (0,008)	0,998	Sí

* Rango de concentración estudiado. ** Se considera diferencia estadística cuando los valores p de la comparación entre las ordenadas en el origen o entre las pendientes son $\leq 0,1$. b: pendiente; S_b: desviación estándar de la pendiente; a: ordenada en el origen; S_a: desviación estándar de la ordenada en el origen, R: coeficiente de correlación (n=6).

Una vez evaluada la ausencia de plaguicidas en las muestras a analizar, se realizó un estudio de las recuperaciones llevando a cabo cinco extracciones de zumos de frutas enriquecidos a dos niveles diferentes de concentración, Tabla IV.4.6. Se observa que los porcentajes de recuperación promedio estuvieron por encima del 73% para todos los plaguicidas en todos los zumos (77-101% para zumo de manzana, 75-103% para zumo de uva, 73-103% para zumo de naranja y 73-93% para zumo de piña), con porcentajes de RSD inferiores al 8,5% en todos los casos.

Por su parte, los LODs del método estuvieron comprendidos entre 1,85 $\mu\text{g/L}$ (1,85 $\mu\text{g/kg}$) y 7,32 $\mu\text{g/L}$ (7,34 $\mu\text{g/kg}$) para los cuatro tipos de zumo. En particular, manzana, 1,91-7,05 $\mu\text{g/L}$, uva, 1,94-7,00 $\mu\text{g/L}$, naranja, 1,85-7,32 $\mu\text{g/L}$ y piña, 1,95-6,58 $\mu\text{g/L}$. Al comparar estos datos con los respectivos LMRs establecidos por la legislación europea para frutas frescas (Tabla IV.4.3), se observa que dichos valores están por debajo de los niveles legislados, por lo que el método desarrollado es útil para la cuantificación de los plaguicidas estudiados en este tipo de muestras.

Fruto de una revisión bibliográfica se pudo comprobar también que la extracción de plaguicidas organofosforados de zumos de frutas por SPE se ha llevado a cabo en un número relativamente bajo de ocasiones (Prince y col., 2001; Albero y col., 2003, 2005; Hu y col., 2004; Pang y col., 2006a; Wang y col., 2006; Picó y Kozmutza, 2007; He y Liu, 2007), en todos los casos haciendo uso de la SPE con cartuchos convencionales (Prince y col., 2001; Albero y col., 2005; Picó y Kozmutza, 2007; He y Liu, 2007) o bien utilizando la MSPD (Albero y col., 2003; Hu y col., 2004; Wang y col., 2006). Los porcentajes de recuperación promedio obtenidos en el presente estudio se encuentran en el mismo orden de magnitud que los obtenidos en trabajos previos para los mismos zumos de frutas: manzana (Prince y col., 2001; Hu y col., 2004; Albero y col., 2005; Wang y col., 2006; Picó y Kozmutza, 2007), uva (Albero y col., 2003, 2005; Picó y Kozmutza, 2007), naranja (Albero y col., 2005; He y Liu, 2007) y piña (Albero y col., 2005), aunque es de destacar que en ninguno de estos trabajos se ha llevado a cabo la determinación simultánea de este grupo de plaguicidas.

Tabla IV.4.6 Porcentajes de recuperación promedio (n=5), porcentajes de RSD (entre paréntesis) y LODs del procedimiento SPE-GC-NPD en muestras de zumo de frutas.

Plaguicida	Nivel* (µg/L)	Zumo de manzana		Zumo de uva		Zumo de naranja		Zumo de piña	
		Recuperación y RSD (%)	LOD (µg/L)	Recuperación y RSD (%)	LOD (µg/L)	Recuperación y RSD (%)	LOD (µg/L)	Recuperación y RSD (%)	LOD (µg/L)
1	14,5	86 (5,4)	2,52	78 (3,5)	2,80	76 (4,0)	2,83	75 (4,6)	2,97
	24,2	93 (3,7)		83 (8,5)		83 (3,0)		76 (5,7)	
2	20,2	77 (4,5)	3,82	76 (3,5)	4,04	73 (3,2)	4,22	73 (3,1)	4,12
	33,7	84 (3,4)		76 (5,2)		73 (6,1)		76 (5,2)	
3	19,2	86 (6,4)	2,50	87 (4,5)	2,52	84 (1,9)	2,50	87 (2,8)	2,44
	32,0	91 (3,5)		88 (4,6)		92 (4,1)		93 (6,2)	
4	11,4	85 (5,1)	1,91	85 (4,0)	1,94	86 (4,0)	1,85	85 (6,1)	1,95
	19,1	89 (4,0)		86 (2,3)		92 (5,3)		84 (3,7)	
5	15,8	90 (3,0)	2,22	87 (5,1)	2,27	89 (2,8)	2,32	88 (5,4)	2,35
	26,3	101 (5,5)		99 (3,5)		93 (3,6)		91 (5,5)	
6	14,3	78 (6,0)	2,67	77 (4,4)	2,82	74 (2,9)	2,89	76 (3,0)	2,82
	23,8	82 (5,3)		75 (4,9)		73 (5,1)		76 (7,3)	
7	15,2	96 (4,5)	2,45	100 (3,3)	2,29	95 (2,7)	2,36	82 (2,3)	2,82
	25,3	94 (3,4)		103 (5,4)		103 (6,3)		83 (2,7)	
8	14,3	80 (4,8)	7,05	80 (3,9)	7,00	74 (3,9)	7,32	81 (3,0)	6,58
	23,8	80 (5,0)		81 (7,6)		80 (2,5)		90 (7,5)	

* Nivel de concentración enriquecido. Identificación: ver Figura IV.4.2.

Por su parte, los LODs también fueron comparables a los obtenidos anteriormente por Wang y col. (2006) para etoprofos, diazinón, malatión, clorpirifos, fenamifos y buprofezín en zumos de manzana, o por Hu y col. (2004) para etoprofos, diazinón, metil-clorpirifos, fenitrotión, malatión y buprofezín también en zumos de manzana. Sin embargo, los LODs obtenidos en estos dos casos fueron superiores en 10 órdenes de magnitud a los obtenidos por Picó y Kozmutza (2007) para fenamifos en zumo de uva o por Alberó y col. (2005) para diazinón, fenitrotión, malatión y clorpirifos en los cuatro zumos de frutas analizados en este estudio. Es de destacar que, en ambos casos, se empleó un detector de MS altamente selectivo.

La Figura IV.4.8 muestra los cromatogramas obtenidos tras aplicar el método SPE-GC-NPD a una muestra de zumo de manzana enriquecida (A) y no

enriquecida (B). Como puede observarse, no se encontraron residuos de los plaguicidas de estudio en la muestra ni interferencias de su matriz. En cuanto a los otros tres tipos de zumos, se obtuvieron resultados similares a los mostrados en la Figura IV.4.8.

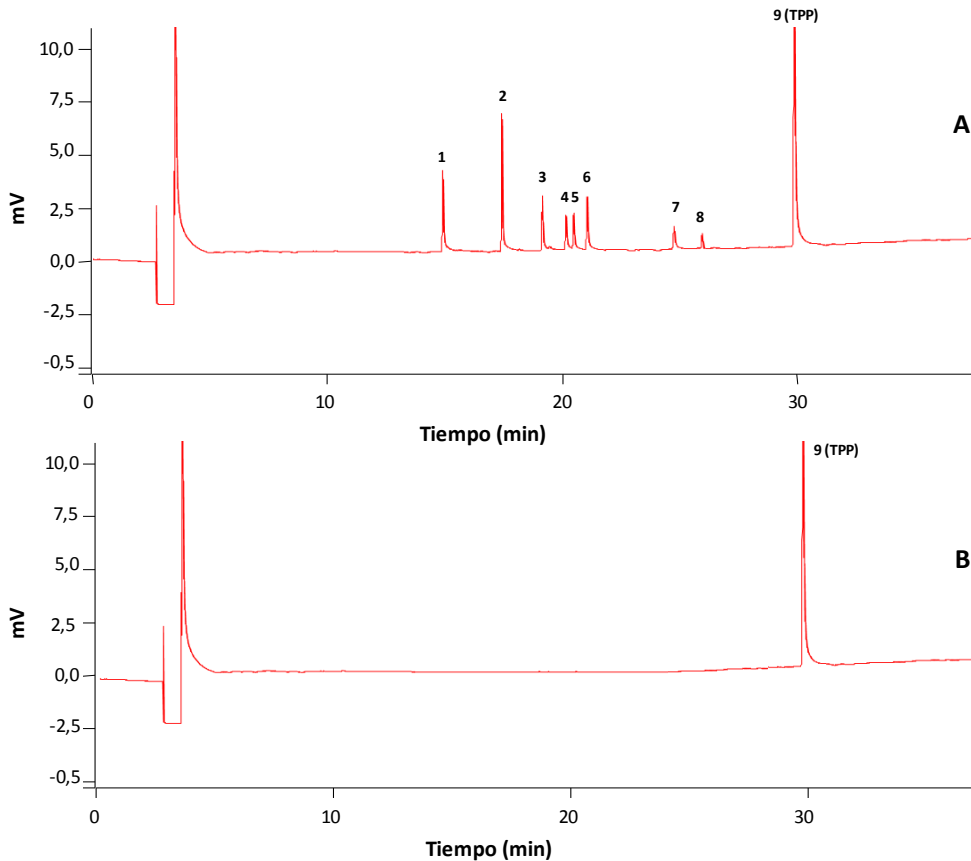


Figura IV.4.8 Cromatogramas obtenidos tras la extracción de una muestra de zumo de manzana enriquecida (A) y sin enriquecer (B) siguiendo el procedimiento SPE-GC-NPD propuesto. Muestra: 30 $\mu\text{g/L}$ de cada plaguicida y 0,64 mg/L de TPP. Identificación y restantes condiciones experimentales: ver Figuras IV.4.2 y IV.4.6.

La validación del método desarrollado también se llevó a cabo a partir de los correspondientes estudios de precisión y exactitud, utilizando la prueba *t-Student* (Miller y Miller, 2002). Para ello, se realizaron cuatro extracciones consecutivas ($n=4$) de las muestras de cada zumo de frutas enriquecidas a tres niveles de concentración. Algunos de estos niveles se seleccionaron con objeto de

demostrar la aplicabilidad del método a concentraciones equivalentes o muy cercanas a los LMRs establecidos para muestras de frutas. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla IV.4.7. Como puede apreciarse, en todos los casos los valores experimentales del estadístico t fueron inferiores al valor tabulado (3,18 para $n=4$), con lo que la hipótesis nula se puede aceptar, no observándose diferencias significativas entre el valor real y el experimental. En lo que respecta a los porcentajes de recuperación aparentes (relación entre la concentración encontrada y la concentración añadida), estos valores estuvieron comprendidos entre el 97 y el 104% para los ocho plaguicidas en las diferentes muestras de zumos. Estos valores no mostraron dependencia con los niveles de concentración estudiados, lo que corrobora la validez del método analítico desarrollado.

IV.4.6 Análisis de diferentes muestras de agua y zumos de frutas comerciales

El método analítico desarrollado se aplicó al análisis de diferentes muestras de agua (mineral, subterránea y de escorrentía) y zumos de frutas (manzana, uva, naranja y piña), con el fin de evaluar la presencia o ausencia de estos plaguicidas en dichas muestras y, por tanto, demostrar la aplicabilidad del método. En concreto, se analizaron seis muestras de agua (dos de cada tipo) y doce muestras de zumo de frutas (tres de cada tipo). Las dos muestras de agua de escorrentía analizadas fueron recogidas en una zona agrícola del municipio de La Laguna (Tenerife) dedicada al cultivo del plátano. Es de destacar el interés por analizar este tipo de muestras, ya que el grupo de plaguicidas seleccionado se utiliza comúnmente en la agricultura canaria para combatir enfermedades relacionadas con los ataques de insectos a la platanera. En cuanto a las muestras de zumo de frutas (todos ellos comerciales), la mayor parte fueron zumos comercializados en el formato de 200 mL, que son consumidos especialmente por niños.

Tras realizar los correspondientes análisis, se observó que ninguna de las muestras estudiadas contenía residuos de los ocho plaguicidas, como mostraron los cromatogramas obtenidos en cada caso, similares al de la Figura IV.4.8B.

Tabla IV.4.7 Resultados del estudio de precisión y exactitud del método desarrollado para la cuantificación de los ocho plaguicidas en muestras de zumo de frutas.

Plaguicida	Añadida ^{a)} (mg/L)	Zumo	Encontrada ^{b)} (mg/L)	Recuperación ^{c)} (%)	t
Etoprofos	0,145	Manzana	0,145 ± 0,027	100	0,00
		Uva	0,148 ± 0,020	102	0,84
		Naranja	0,141 ± 0,024	97	1,45
		Piña	0,146 ± 0,044	101	0,23
	0,484	Manzana	0,487 ± 0,025	101	0,94
		Uva	0,490 ± 0,018	101	2,04
		Naranja	0,484 ± 0,022	100	0,00
		Piña	0,482 ± 0,041	99	1,10
	0,968	Manzana	0,970 ± 0,026	100	0,50
		Uva	0,962 ± 0,019	99	1,55
		Naranja	0,970 ± 0,023	100	0,31
		Piña	0,970 ± 0,043	100	0,92
Diazinón	0,202	Manzana	0,203 ± 0,035	100	0,23
		Uva	0,202 ± 0,044	100	0,00
		Naranja	0,206 ± 0,035	102	1,50
		Piña	0,206 ± 0,047	102	0,94
	0,673	Manzana	0,672 ± 0,032	100	0,16
		Uva	0,676 ± 0,041	100	1,07
		Naranja	0,674 ± 0,033	100	0,06
		Piña	0,678 ± 0,044	101	1,86
	1,35	Manzana	1,35 ± 0,034	100	0,00
		Uva	1,35 ± 0,043	100	0,00
		Naranja	1,34 ± 0,034	100	0,74
		Piña	1,34 ± 0,046	100	0,12
Metil-clorpirifos	0,192	Manzana	0,187 ± 0,043	97	1,19
		Uva	0,196 ± 0,032	102	1,18
		Naranja	0,199 ± 0,043	104	1,85
		Piña	0,198 ± 0,023	103	1,69
	0,639	Manzana	0,642 ± 0,040	100	0,29
		Uva	0,639 ± 0,030	100	0,00
		Naranja	0,636 ± 0,041	100	0,57
		Piña	0,635 ± 0,022	99	0,91
	1,28	Manzana	1,28 ± 0,042	100	0,00
		Uva	1,28 ± 0,031	100	0,00
		Naranja	1,28 ± 0,042	100	0,00
		Piña	1,28 ± 0,023	100	0,00

(Continúa en la página siguiente)

Tabla IV.4.7 (Continuación).

Plaguicida	Añadida ^{a)} (mg/L)	Zumo	Encontrada ^{b)} (mg/L)	Recuperación ^{c)} (%)	t
Fenitrotión	0,114	Manzana	0,115 ± 0,028	101	0,39
		Uva	0,117 ± 0,016	102	1,15
		Naranja	0,118 ± 0,019	103	2,18
		Piña	0,116 ± 0,024	101	1,29
	0,382	Manzana	0,379 ± 0,026	99	0,90
		Uva	0,383 ± 0,015	100	0,12
		Naranja	0,379 ± 0,018	99	0,60
		Piña	0,381 ± 0,023	100	0,05
	0,763	Manzana	0,766 ± 0,027	100	0,43
		Uva	0,763 ± 0,016	100	0,00
		Naranja	0,765 ± 0,018	100	0,31
		Piña	0,760 ± 0,024	100	1,19
Malatión	0,158	Manzana	0,161 ± 0,017	102	1,96
		Uva	0,158 ± 0,017	100	0,00
		Naranja	0,152 ± 0,014	97	1,15
		Piña	0,163 ± 0,039	103	2,10
	0,525	Manzana	0,526 ± 0,016	100	0,14
		Uva	0,519 ± 0,016	99	1,99
		Naranja	0,521 ± 0,013	99	1,48
		Piña	0,527 ± 0,036	100	1,53
	1,05	Manzana	1,06 ± 0,017	100	0,41
		Uva	1,06 ± 0,016	100	0,78
		Naranja	1,05 ± 0,013	100	0,00
		Piña	1,05 ± 0,038	100	0,00
Clorpirifos	0,143	Manzana	0,146 ± 0,012	102	1,69
		Uva	0,146 ± 0,033	102	0,92
		Naranja	0,140 ± 0,015	98	1,69
		Piña	0,139 ± 0,020	98	1,70
	0,476	Manzana	0,476 ± 0,011	100	0,00
		Uva	0,469 ± 0,031	98	2,05
		Naranja	0,476 ± 0,014	100	0,00
		Piña	0,478 ± 0,019	100	0,82
	0,952	Manzana	0,954 ± 0,011	100	0,12
		Uva	0,960 ± 0,032	101	1,58
		Naranja	0,953 ± 0,015	100	0,22
		Piña	0,950 ± 0,020	100	0,39

(Continúa en la página siguiente)

Tabla IV.4.7 (Continuación).

Plaguicida	Añadida ^{a)} (mg/L)	Zumo	Encontrada ^{b)} (mg/L)	Recuperación ^{c)} (%)	t
Fenamifos	0,152	Manzana	0,154 ± 0,037	101	1,50
		Uva	0,151 ± 0,050	99	0,37
		Naranja	0,156 ± 0,015	104	1,43
		Piña	0,152 ± 0,046	100	0,00
	0,506	Manzana	0,507 ± 0,035	100	0,20
		Uva	0,508 ± 0,047	100	0,46
		Naranja	0,503 ± 0,014	99	1,29
		Piña	0,509 ± 0,043	100	0,70
	1,01	Manzana	1,02 ± 0,037	100	1,78
		Uva	1,02 ± 0,049	101	1,18
		Naranja	1,01 ± 0,015	100	0,00
		Piña	1,02 ± 0,045	100	0,42
Buprofezín	0,143	Manzana	0,149 ± 0,024	104	1,71
		Uva	0,143 ± 0,012	100	0,00
		Naranja	0,147 ± 0,025	103	1,68
		Piña	0,149 ± 0,033	104	1,13
	0,476	Manzana	0,477 ± 0,022	100	0,07
		Uva	0,474 ± 0,012	100	1,19
		Naranja	0,475 ± 0,025	100	0,14
		Piña	0,480 ± 0,031	101	0,67
	0,952	Manzana	0,958 ± 0,024	101	0,88
		Uva	0,957 ± 0,012	101	1,68
		Naranja	0,959 ± 0,025	101	0,50
		Piña	0,949 ± 0,032	100	1,37

^{a)} Concentración añadida; ^{b)} Concentración encontrada: valor medio ± desviación estándar de cuatro determinaciones a un nivel de confianza del 95%; ^{c)} Porcentaje de recuperación aparente.

El procedimiento de SPE desarrollado en este estudio haciendo uso de MWCNTs como fase estacionaria resultó ser una buena alternativa para la extracción rápida y cuantitativa de estos plaguicidas tanto de muestras de agua como de zumos. Además, entre las ventajas principales del uso de los MWCNTs empleados en este trabajo (MWCNTs de 10 a 15 nm de diámetro externo) destacan su elevada capacidad de extracción, selectividad y bajo coste respecto de los empleados anteriormente en otros estudios (Zhou y col., 2006b, 2007a; Wang y col., 2007a; El-Sheikh y col., 2007, 2008; Min y col., 2008; Katsumata y col., 2008). De hecho, teniendo en cuenta que por cada extracción se utilizan pequeñas cantidades de estos MWCNTs (40 mg) y que en España 5 g cuestan aproximadamente 57€, esto representaría un gasto económico de aproximadamente 0,46€

por extracción. Sin embargo, el uso de cartuchos convencionales de SPE supone un gasto mayor (aproximadamente 8€ por cartucho, lo que indica un ahorro del 94%). En cuanto a los MWCNTs utilizados en otros estudios de la literatura (de 30 a 60 nm de diámetro externo), estos MWCNTs son, en general, unas tres veces más caros que los empleados en este estudio, y las cantidades utilizadas suelen ser de dos a cuatro veces mayores (Zhou y col., 2006b, 2007a; Wang y col., 2007a; El-Sheikh y col., 2007, 2008; Min y col., 2008; Katsumata y col., 2008). Además, los SWCNTs son, incluso, más caros.

IV.4.7 Conclusiones

- Se ha desarrollado un método de análisis de ocho plaguicidas, en su mayoría insecticidas (siete organofosforados, etoprofos, diazinón, metil-clorpirifos, fenitrotión, malatión, clorpirifos, fenamifos y una tiadiazina, buprofezín) en muestras de agua (mineral, subterránea y de escorrentía) y zumos de frutas (manzana, uva, naranja y piña) mediante SPE-GC-NPD.
- La etapa de extracción y preconcentración de la muestra se llevó a cabo utilizando MWCNTs de bajo diámetro externo (10-15 nm) como fase estacionaria para SPE, que presentan una serie de ventajas, entre las que destacan el uso de pequeñas cantidades de fase estacionaria (40 mg), alta selectividad y capacidad de extracción y bajo coste.
- Los parámetros de extracción (cantidad de MWCNTs, volumen y pH de la muestra, así como volumen y tipo de disolvente de elución) se optimizaron factor a factor. Las condiciones óptimas de extracción fueron: 40 mg de MWCNTs, 800 mL y 10 mL de muestra para aguas y zumos de frutas, respectivamente, a pH 6,0 y 20 mL de diclorometano como disolvente de elución. Además, en el caso de los zumos de frutas, fue necesario diluir la muestra 1:1 (v/v) zumo:agua Milli-Q y realizar un lavado previo a la etapa de secado con 2 mL, 6 mL, 3 mL y 6 mL de agua Milli-Q para los zumos de manzana, uva, naranja y piña, respectivamente.

- La evaluación del efecto matriz en zumos a partir de la comparación entre las rectas de calibrado de las muestras con las del estándar disuelto en ciclohexano mostró la necesidad de realizar un calibrado específico con la matriz.
- La introducción de la etapa de SPE con MWCNTs previa a la determinación por GC-NPD permitió una adecuada cuantificación, así como alcanzar LODs por debajo de los niveles legislados, 0,018-0,041 $\mu\text{g/L}$, 0,019-0,073 $\mu\text{g/L}$ y 0,025-0,058 $\mu\text{g/L}$ en agua mineral, subterránea y de escorrentía, excepto para el buprofezín que fueron 0,076, 0,102 y 0,117 $\mu\text{g/L}$, respectivamente, y 1,91-7,05 $\mu\text{g/L}$, 1,94-7,00 $\mu\text{g/L}$, 1,85-7,32 $\mu\text{g/L}$ y 1,95-6,58 $\mu\text{g/L}$ en zumos de manzana, uva, naranja y piña, respectivamente.
- Los parámetros de validación del método en términos de linealidad, recuperación, precisión, exactitud y selectividad mostraron que dicho método puede ser aplicado satisfactoriamente al análisis cuantitativo de este grupo de plaguicidas en muestras de agua y zumos de frutas. Los porcentajes de recuperación obtenidos en las muestras de agua estuvieron comprendidos entre el 57 y el 109% para todos los plaguicidas en todas las muestras (excepto para el fenamifos, que oscilaron entre el 40 y el 84%). En cuanto a los zumos de frutas, estos valores estuvieron comprendidos entre el 73 y el 103% en todos los casos.
- La aplicación del método estudiado al análisis de seis muestras de agua (dos de cada tipo) y doce muestras de zumo de frutas (tres de cada tipo) reveló que ninguno de los ocho plaguicidas estudiados estaba presente en las muestras analizadas.

IV.5 Aplicación de la microextracción líquido-líquido dispersiva con líquidos iónicos como agentes de extracción para el análisis de plaguicidas en plátanos.

En esta sección se describe el análisis de un grupo de ocho plaguicidas de diferentes familias (metil-tiofanato, carbofurano, carbaril, tebuconazol, iprodiona, oxifluorfén, hexitiazox y fenazaquín) en plátanos por HPLC-DAD utilizando la DLLME con hexafluorofosfato de 1-hexil-3-metilimidazolio ($[\text{C}_6\text{MIm}][\text{PF}_6]$) como técnica de extracción y preconcentración. El pH de la muestra, porcentaje de NaCl, cantidad de líquido iónico y volumen de disolvente dispersor se optimizaron mediante un diseño experimental. El método DLLME-HPLC-DAD optimizado permite determinar este grupo de plaguicidas en muestras de plátano a niveles de $\mu\text{g}/\text{kg}$, valores inferiores a los correspondientes LMRs establecidos por la legislación europea. La metodología desarrollada se aplicó al análisis de varias muestras de plátano comerciales, procedentes de cultivos regionales tanto ecológicos como no ecológicos.

IV.5.1 Antecedentes

En los últimos años, el interés creciente por simplificar y miniaturizar la etapa de preparación de la muestra y minimizar la cantidad de disolvente orgánico utilizado en dicha etapa ha dado lugar al desarrollo de diferentes técnicas de microextracción (SPME, SBSE, LPME, etc.), entre las que destaca la DLLME por las numerosas ventajas que presenta: bajo coste, bajo consumo de disolventes y reactivos, simplicidad, rapidez, fácil automatización, etc. La mayor parte de sus aplicaciones se localizan en la extracción de diferentes compuestos, tanto orgánicos como inorgánicos, de muestras acuosas (García-López y col., 2007; Rezaee y col., 2009), siendo bastante limitado el número de trabajos publicados hasta el momento sobre la extracción de analitos de matrices distintas a las anteriores. En estos estudios se han determinado principalmente compuestos orgánicos en matrices alimentarias (Fariña y col., 2007; Zhao y col., 2007; Chen y col., 2008a, 2009; Zang y col., 2008; Xiong y Hu, 2008; Daneshfar y col., 2009; Fu y col., 2009; Moinfar y Milani-Hosseini, 2009), biológicas (Yazdi y col., 2008; Liang y Sang, 2008; Xiong y col., 2009; Melwani y col., 2009) y medioambientales (Xiong y

Hu, 2008; Hu y col., 2009; Wu y col., 2009; Sereshti y col., 2009), tal como puede apreciarse en la Tabla IV.5.1.

Tabla IV.5.1 Estudios sobre el empleo de la DLLME en el análisis de muestras no acuosas.

Analitos	Matriz	Método analítico	Disolvente de extracción	Disolvente dispersor	Referencia
Insecticidas	Té verde	GC-FPD	<i>n</i> -hexano	Acetonitrilo	Moinfar y Milani-Hosseini, 2009
PCBs*	Suelo	GC-ECD	Clorobenceno	Acetona	Hu y col., 2009
Fungicidas	Suelo	HPLC-FD	Cloroformo	Tetrahidrofurano	Wu y col., 2009
Fármacos psicotrópicos	Orina humana	HPLC-UV	Tetracloruro de carbono	Acetonitrilo	Xiong y col., 2009
Colesterol	Yema de huevo, leche, aceite de oliva	HPLC-UV	Tetracloruro de carbono	Etanol	Daneshfar y col., 2009
Componentes solubles en agua	Aceite esencial Rosa Damascena	GC-MS	Cloroformo	Etanol	Sereshti y col., 2009
Insecticidas	Zumos de melocotón, uva y manzana	HPLC-FD	Tetracloroetano	Acetonitrilo	Fu y col., 2009
Antibióticos	Miel	HPLC-DAD	Tetracloroetano	Acetonitrilo	Chen y col., 2009
Fármacos ansiolíticos	Orina humana	HPLC-MS/MS	Diclorometano	Alcohol isopropílico	Melwanki y col., 2009
Fungicidas	Manzana	GC-ECD	Clorobenceno	Acetona	Zang y col., 2008
Antibióticos	Miel	HPLC-DAD	Tetracloroetano	Acetonitrilo	Chen y col., 2008a
Plomo	Pelo y orina humanos	GFAAS**	Tetracloruro de carbono	Etanol	Liang y Sang, 2008
Antidepresivos	Plasma humano	GC-FID	Tetracloruro de carbono	Metanol	Yazdi y col., 2008
Insecticidas	Suelo, té verde, hoja de té	GC-FPD	Tetracloruro de carbono	Metanol	Xiong y Hu, 2008
Insecticidas	Sandía y pepino	GC-FPD	Clorobenceno	Acetonitrilo	Zhao y col., 2007
Fenoles	Vino tinto	GC-MS	Tetracloruro de carbono	Acetona	Fariña y col., 2007

* PCBs: Bifenilos policlorados.

** GFAAS: Absorción atómica con cámara de grafito.

También puede observarse que el uso de la DLLME para la extracción y preconcentración de plaguicidas de muestras distintas a las acuosas ha sido poco explorado hasta el momento. De hecho, únicamente se han publicado cinco trabajos relacionados con matrices alimentarias (Zhao y col., 2007; Xiong y Hu, 2008; Zang y col., 2008; Fu y col., 2009; Moinfar y Milani-Hosseini, 2009), en los que se han determinado dos insecticidas (carbaril y triazofos) en zumos de melocotón, uva y manzana (Fu y col., 2009), otros diez insecticidas (forato, diazinón, disulfotón, metil-paratión, sumitién, malatión, fentién, profenofos, etién y fosalón) en té (Moinfar y Milani-Hosseini, 2009), tres fungicidas (captan, folpet y captafol) en manzana (Zang y col., 2008), seis insecticidas (malatión, clorpirifos, buprofezín, triazofos, carbosulfano y piridabeno) en té (Xiong y Hu, 2008) y otros seis insecticidas (etoprofos, metil-paratión, fenitrotión, malatión, clorpirifos y profenofos) en sandía y pepino (Zhao y col., 2007). En cuanto a las matrices medioambientales, únicamente existen dos trabajos en la literatura en los que se han analizado dos fungicidas (carbendazima y tiabendazol, Wu y col., 2009) y seis insecticidas (malatión, clorpirifos, buprofezín, triazofos, carbosulfano y piridabeno, Xiong y Hu, 2008) en suelos.

La tendencia actual hacia el empleo de pequeños volúmenes de disolvente de extracción que sean menos tóxicos, volátiles y contaminantes respecto de los convencionales ha originado un interés creciente por el uso de los líquidos iónicos como agentes de extracción en DLLME. Sin embargo, hasta el momento son muy pocos los trabajos publicados al respecto (ver Tabla IV.5.2) y en todos los casos se han analizado muestras de agua. Además, tres de estos estudios están dedicados a la extracción de diferentes grupos de plaguicidas: cuatro insecticidas (fipronilo, clorfenapir, buprofezín y hexitiazox) de aguas de suministro urbano, de lago y de fuente (Liu y col., 2009), dos insecticidas (metil-paratión y foxím) de aguas de lluvia, subterránea, de embalse y de río (Zhou y col., 2008a) y cinco insecticidas (cihalotrín, deltametrín, fenvalerato, tauflualinato y bifentrín) de aguas de suministro urbano, subterránea, de río y de embalse (Zhou y col., 2008b). Por tanto, es de gran interés extender la aplicación de la DLLME con líquidos iónicos para la extracción y preconcentración de compuestos, en particular plaguicidas, de muestras no acuosas. Con este fin, en la presente sección se seleccionó un grupo

de ocho plaguicidas de diferentes familias y ámbitos de aplicación (metil-tiofanato, carbofurano, carbaril, tebuconazol, iprodiona, oxifluorfen, hexitiazox y fenazaquin) de uso bastante común en las Islas Canarias en el cultivo del plátano. Tal como se ha mencionado en la sección I.1.6, la producción agrícola canaria es mayoritaria en este cultivo (30% de la producción agrícola regional), lo que convierte a la región en el principal productor de plátanos de la UE. Esto, junto con el hecho de que Canarias sea la Comunidad Autónoma con mayor consumo de plaguicidas, hace que el análisis de este tipo de compuestos en plátanos alcance una importancia todavía mayor.

Tabla IV.5.2 Estudios sobre el empleo de los líquidos iónicos como disolventes de extracción en DLLME.

Analitos	Matriz	Método analítico	Disolvente de extracción	Disolvente dispersor	Referencia
Insecticidas	Aguas de suministro urbano, de lago y de fuente	HPLC-DAD	[C ₆ MIm][PF ₆]	Metanol	Liu y col., 2009
Mercurio	Aguas	Espectrofotometría	[C ₆ MIm][NTF ₂]	Acetona	Gharehbaghi y col., 2009
Aminas aromáticas	Aguas de suministro urbano, de río y residual	HPLC-DAD	[C ₄ MIm][PF ₆]	-	Fan y col., 2008
Insecticidas	Aguas de río, de lluvia, de embalse y subterránea	HPLC-UV	[C ₆ MIm][PF ₆]	-	Zhou y col., 2008a
Insecticidas	Aguas de suministro urbano, subterránea, de río y de embalse	HPLC-UV	[C ₆ MIm][PF ₆]	-	Zhou y col., 2008b

[C₆MIm][PF₆]: Hexafluorofosfato de 1-hexil-3-metilimidazolio.

[C₆MIm][NTF₂]: Bis-trifluorometilsulfonilimida de 1-hexil-3-metilimidazolio.

[C₄MIm][PF₆]: Hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazolio.

IV.5.2 Separación por HPLC-DAD

Los ocho plaguicidas seleccionados para el presente estudio pertenecen a las familias de los benzimidazoles (metil-tiofanato), carbamatos (carbofurano y carbaril), triazoles (tebuconazol), dicarboximidias (iprodiona), difeniléteres (oxifluorfen), carboxamidas (hexitiazox) y quinazolininas (fenazaquin) (*The e-pesticide manual*, 2001). La Figura IV.5.1 muestra sus estructuras químicas.

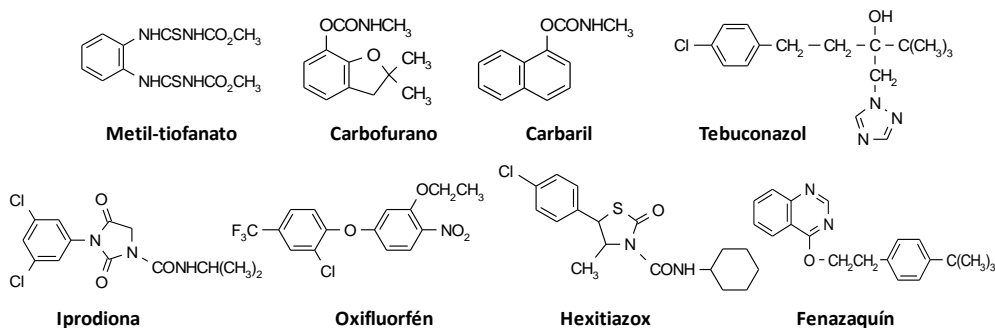


Figura IV.5.1 Estructuras químicas de los ocho plaguicidas estudiados.

En Canarias, estos plaguicidas son especialmente importantes para combatir plagas de hongos, nemátodos, insectos y ácaros de las plataneras (ver Tabla IV.5.3). En la actualidad, su uso en dichos cultivos se encuentra autorizado por el MARM (<http://www.mapa.es/es/agricultura/pags/fitos/registro/menu.asp>), excepto en el caso del cabofurano y el carbaril, cuya utilización ha sido prohibida recientemente. De hecho, la fecha límite de comercialización del carbofurano fue el 13 de junio de 2008 y la del carbaril el 21 de julio de 2008, quedando prohibido su uso seis meses después. Además es de destacar que, en el caso del carbofurano, se presentó el 6 de mayo de 2008 la solicitud para su inclusión en el Anexo de sustancias permitidas por la UE (Anexo I de la Directiva 91/414/CEE), aunque se debe esperar hasta el 2011 para la correspondiente resolución. En la Tabla IV.5.3 se recogen también los LMRs establecidos en plátano (incluida la piel) por la legislación europea en el momento de la realización de este estudio (2009).

Con el fin de separar simultáneamente estos ocho plaguicidas por HPLC-DAD, inicialmente se llevaron a cabo una serie de experiencias, tanto en régimen isocrático como en régimen gradiente, a un flujo de 1,0 mL/min, utilizando 100% de agua Milli-Q como fase móvil A y 100% de acetonitrilo como fase móvil B. En cada uno de estos ensayos iniciales se inyectó un volumen de 20 µL (0,25 mg/L de cada plaguicida disueltos en acetonitrilo) y se monitorizaron las correspondientes longitudes de onda en el rango 205-250 nm. Fruto de estos estudios se llegó a la conclusión de que la utilización de un gradiente proporcionaba una mayor resolución de los picos respecto del régimen isocrático.

Tabla IV.5.3 Algunas características de los plaguicidas estudiados (*The e-pesticide manual*, 2001).

Plaguicida	Mw (g/mol)	Actividad	Uso autorizado*	LMR (mg/kg)**
Metil-tiofanato	342,4	Fungicida	Sí	0,1
Carbofurano	221,3	Insecticida/nematicida	No	0,02
Carbaril	201,2	Insecticida	No	0,05
Tebuconazol	307,8	Fungicida	Sí	0,05
Iprodiona	330,2	Fungicida	Sí	0,02
Oxifluorfén	361,7	Herbicida	Sí	0,05
Hexitiazox	352,9	Acaricida	Sí	0,5
Fenazaquín	306,4	Acaricida	Sí	0,2

* Uso autorizado en platanera por el MARM en el momento de la realización de este estudio (2009).

** LMRs establecidos en plátano por la Comisión Europea en el momento de la realización de este estudio (2009, http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm?event=substance.selection&ch=1).

Tras aplicar diferentes programas de gradientes de elución se observó que los mejores resultados en términos de resolución, eficacia y tiempos de análisis se obtenían al emplear el programa detallado en la Tabla III.5.1. Además, a partir de los correspondientes espectros de absorción se comprobó que casi todos los plaguicidas presentaban máximos de absorción a 205 nm, excepto carbaril y tebuconazol, que presentaban un máximo a 220 nm, y fenazaquín, con un máximo a 215 nm, ver Tabla IV.5.4. Estos valores fueron seleccionados para realizar las siguientes experiencias.

La Figura IV.5.2 muestra los cromatogramas de la separación de los ocho plaguicidas por HPLC-DAD teniendo en cuenta las longitudes de onda de máxima absorción. Se observa, además, que a estas longitudes de onda tan bajas aparecen algunas interferencias que pueden ser debidas a la absorción por parte de las impurezas de los disolventes utilizados como fase móvil, aunque dichas interferencias no dificultaron la correcta detección y cuantificación de los analitos. Puede observarse, también, como la absorción de estas impurezas disminuye a medida que aumenta la longitud de onda.

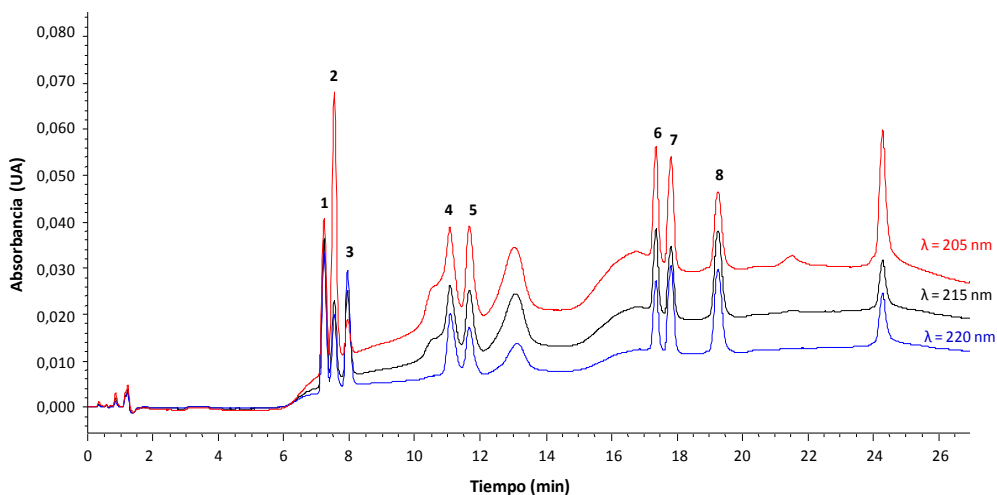


Figura IV.5.2 Cromatogramas de la separación por HPLC-DAD de los ocho plaguicidas de estudio a las longitudes de onda de máxima absorción. Fase móvil A: 100% de agua Milli-Q. Fase móvil B: 100% de acetonitrilo. Flujo: 1,0 mL/min. Programa de gradiente de elución: ver Tabla III.5.1. Inyección: 20 μ L. Muestra disuelta en acetonitrilo: (1) Metil-tiofanato (3,4 mg/L), (2) carbofurano (5,4 mg/L), (3) carbaril (0,57 mg/L), (4) tebuconazol (6,8 mg/L), (5) iprodiona (2,3 mg/L), (6) oxifluorfen (2,2 mg/L), (7) hexitiazox (5,0 mg/L) y (8) fenazaquin (2,4 mg/L).

Una vez establecidas las mejores condiciones de separación, se realizaron los correspondientes estudios de repetibilidad y calibrado, cuyos resultados se resumen en la Tabla IV.5.4. La repetibilidad del método se evaluó inyectando tres veces consecutivas tres niveles de concentración diferentes (0,50, 1,0 y 2,5 mg/L) en el mismo día ($n=3$) y en cinco días diferentes ($n=15$). Como se puede observar en dicha tabla, en lo que respecta a la precisión en un mismo día, los porcentajes de RSD fueron inferiores al 0,97% para los tiempos de retención y al 4,7% para las áreas de pico. En cuanto a la precisión entre días, estos estudios muestran porcentajes de RSD por debajo del 0,84% y del 4,8% para los tiempos de retención y áreas de pico, respectivamente. Estos resultados indican, por tanto, que el método desarrollado es repetible en las condiciones señaladas. Las rectas de calibrado (basadas en áreas de pico) se obtuvieron inyectando, por triplicado, siete niveles diferentes de concentración (intervalo entre 0,010 y 6,83 mg/L). Los resultados, que se muestran en la Tabla IV.5.4, indican que el método HPLC-DAD utilizado es lineal en el rango de concentraciones estudiado, con coeficientes de correlación (R) superiores a 0,998 y LODs que oscilaron entre 1,81 μ g/L (carbaril) y 34,1 μ g/L (tebuconazol).

IV.5.3 Optimización del procedimiento de DLLME

Considerando que en el plátano pueden aparecer residuos de los ocho plaguicidas seleccionados, se aplicó la metodología descrita (HPLC-DAD) al análisis de este tipo de muestras. Para ello, se desarrolló un método de extracción y preconcentración de los analitos previo a la determinación cromatográfica. En concreto, se utilizó la DLLME con un líquido iónico como agente de extracción cuya optimización, llevada a cabo con muestras de agua Milli-Q, se describe a continuación.

Las primeras experiencias realizadas tuvieron como objetivo seleccionar el líquido iónico más adecuado para la extracción, teniendo en cuenta algunos requisitos como: baja solubilidad en agua, permanencia en estado líquido a la temperatura de trabajo, densidad superior a la del agua y buena solubilidad para moléculas orgánicas, lo que se traduce en una adecuada capacidad de extracción de los plaguicidas en estudio. Tras realizar una revisión bibliográfica se pudo comprobar que los líquidos iónicos que mejor se ajustaban a estas condiciones eran aquellos que contienen el anión hexafluorofosfato unido a una cadena alquílica hidrofóbica (Huddleston y col., 2001), como son el hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazolio ($[C_4MIm][PF_6]$) y el hexafluorofosfato de 1-hexil-3-metilimidazolio ($[C_6MIm][PF_6]$), que además son líquidos iónicos comerciales relativamente económicos (Shamsi y Danielson, 2007; Buszewski y Studzinska, 2008; Liu y col., 2009). Sus estructuras químicas se muestran en la Figura IV.5.3. Por tanto, se realizaron ensayos con ambos líquidos iónicos como agentes de extracción. Para ello se introdujo rápidamente, con ayuda de una micropipeta, una disolución constituida por 52 mg de cada líquido iónico disueltos en 500 μ L de metanol (por ser, junto con el acetonitrilo y la acetona, uno de los disolventes de dispersión más comunes en DLLME, Wang y col., 2008b; Liu y col., 2009) en una muestra de 10 mL de agua Milli-Q enriquecida (22 μ g/L de cada plaguicida).

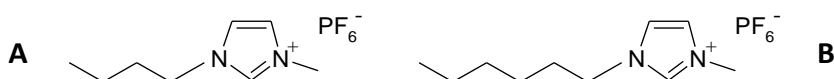


Figura IV.5.3 Estructuras químicas del $[C_4MIm][PF_6]$ (A) y del $[C_6MIm][PF_6]$ (B).

Tabla IV.5.4 Datos de validación del método de determinación de los ocho plaguicidas por HPLC-DAD en términos de repetibilidad y calibrado.

Plaguicida (longitud de onda máxima, nm)	Precisión en un mismo día ^{a)} (n=3)		Precisión entre días ^{a)} (n=15)		Datos de calibración				LOD ^{c)} (µg/L)
	t _r (RSD %)	Área (RSD %)	t _r (RSD %)	Área (RSD %)	Rango (mg/L) ^{b)}	b (S _b)	a (S _a)	R	
Meti-tiofanato (205)	0,82	4,0	0,84	1,6	0,061-3,42	8,81x10 ⁴ (1419)	-1796 (2621)	0,998	17,6
Carbofurano (205)	0,94	1,8	0,42	2,3	0,097-5,44	1,02x10 ⁵ (936)	-1111 (2749)	0,999	15,5
Carbaril (220)	0,97	2,9	0,80	3,2	0,010-1,02	4,58x10 ⁵ (4061)	-2882 (1980)	0,999	1,81
Tebuconazol (220)	0,49	0,51	0,22	3,1	0,122-6,83	2,40x10 ⁴ (452)	-2235 (1667)	0,998	34,1
Iprodiona (205)	0,71	1,6	0,43	4,8	0,041-2,31	1,29x10 ⁵ (1340)	-4600 (2049)	0,999	13,6
Oxifluortén (205)	0,18	2,3	0,19	4,4	0,040-2,24	1,12x10 ⁵ (1596)	-1804 (1928)	0,999	10,3
Hexitiazox (205)	0,26	4,7	0,15	3,5	0,089-5,01	5,71x10 ⁴ (825)	-148 (2232)	0,999	24,3
Fenazaquin (215)	0,74	2,5	0,34	3,6	0,043-2,42	1,30x10 ⁵ (1979)	-3307 (2583)	0,998	15,4

^{a)} Resultados obtenidos a una concentración de 1,0 mg/L. ^{b)} Rango de concentración estudiado (mg/L). ^{c)} Calculado como tres veces la relación señal/ruido.

^{b)} pendiente; ^{S_b}: desviación estándar de la pendiente; ^{a)} ordenada en el origen; ^{S_a}: desviación estándar de la ordenada en el origen, ^R: coeficiente de correlación.

Tras agitar vigorosamente pudo comprobarse que, a diferencia de la muestra que contenía $[C_4MIm][PF_6]$, la muestra con $[C_6MIm][PF_6]$ como líquido iónico presentaba una turbidez apreciable, con gotas de fase orgánica inmiscibles en la muestra acuosa, gotas que sedimentaban tras centrifugar y que fueron inyectadas en el sistema cromatográfico una vez disueltas en 120 μ L de acetonitrilo. Por su parte, la muestra que contenía el líquido iónico $[C_4MIm][PF_6]$ resultó ser prácticamente transparente, sin separación aparente de fases. Este hecho puede deberse tanto a su solubilidad, que es mayor que la del $[C_6MIm][PF_6]$ (1,88 y 0,75 g/100 mL, respectivamente, Chun y col., 2001; Liu y col., 2003), como a su viscosidad que es menor respecto de la del $[C_6MIm][PF_6]$ (450 y 586 cP a 25°C, respectivamente, Huddleston y col., 2001; Liu y col., 2003). Por tanto, se seleccionó el $[C_6MIm][PF_6]$ como agente de extracción de DLLME.

Una vez seleccionado el líquido iónico más adecuado, se procedió a la optimización del procedimiento DLLME haciendo uso de un diseño compuesto centrado. Previamente se llevaron a cabo una serie de estudios preliminares (*screening*) para evaluar cómo influyen los distintos factores: cantidad de agente de extracción, volumen y tipo de agente dispersor, tiempo y temperatura de extracción, tiempo de centrifugación, pH de la muestra y adición de sales (*salting-out*) y seleccionar los correspondientes niveles para cada factor en el diseño experimental. Para realizar dichos estudios se utilizaron 10 mL de agua Milli-Q enriquecida con los analitos a una concentración de 22 μ g/L. En primer lugar se estudió la influencia del pH de la muestra, realizando extracciones de muestras de agua Milli-Q a distintos valores de pH (3, 6 y 8). Para ello, se inyectó en la muestra una disolución constituida por 52 mg de $[C_6MIm][PF_6]$ en 500 μ L de metanol, se centrifugó la mezcla resultante durante 15 minutos a 4000 rpm y la fase orgánica depositada (20 μ L) se disolvió en acetonitrilo hasta alcanzar un volumen final de 125 μ L. Fruto de este estudio se pudo comprobar que a pHs elevados el líquido iónico se hace más soluble en la muestra, dificultando, por tanto, la separación de fases y la extracción de los plaguicidas, especialmente de metil-tiofanato, carbofurano y carbaril (ver Figura IV.5.4A). Además, en general, las mejores recuperaciones de los analitos bajo estas condiciones iniciales se obtuvieron a pH 6 (entre el 30 y 92%), valor que fue utilizado para llevar a cabo el siguiente estudio,

basado en la influencia de la adición de NaCl. En concreto, se realizaron experiencias con las mismas condiciones anteriores, pero esta vez con la adición de un 15 y 25% (p/v) de NaCl para favorecer el efecto de *salting-out*, ver Figura IV.5.4B. Los resultados mostraron que, en general, a medida que aumentaba el porcentaje de NaCl, las recuperaciones de los analitos también incrementaban, especialmente para metil-tiofanato, carbofurano, carbaril, tebuconazol e iprodiona, Figura IV.5.4B. Por tanto, las siguientes experiencias se llevaron a cabo añadiendo un 25% (p/v) de NaCl en la muestra, ya que mejoró los porcentajes de recuperación anteriores (ahora entre el 48 y 99%).

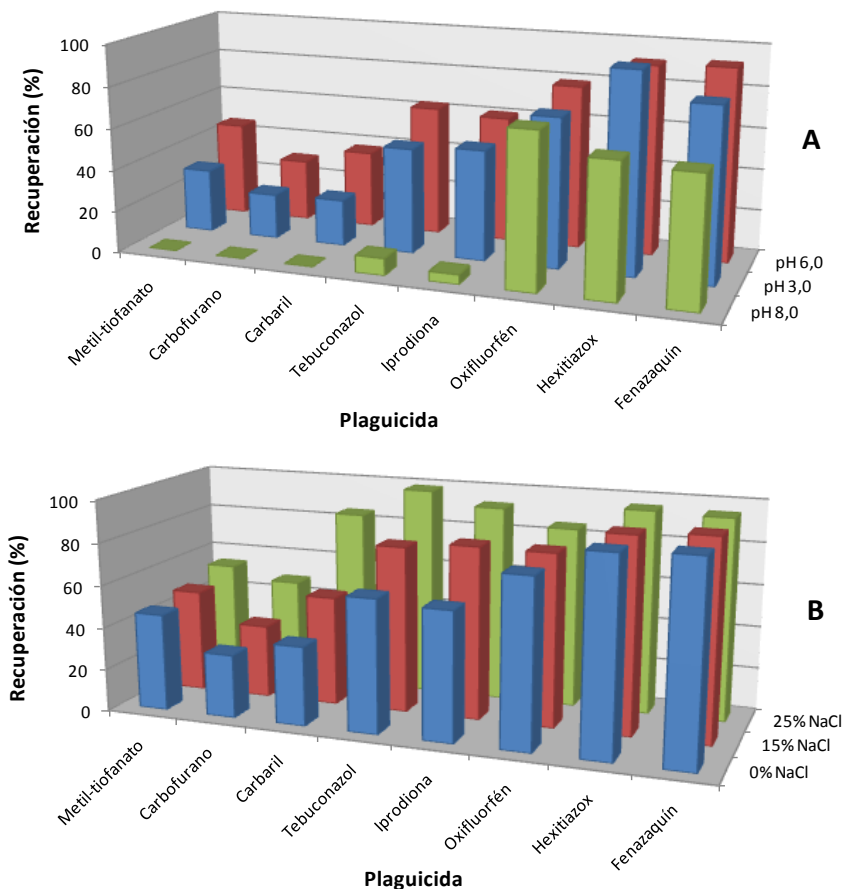


Figura IV.5.4 Influencia del pH de la muestra (A) y del porcentaje de NaCl (B) en la extracción de los ocho plaguicidas de agua Milli-Q. Condiciones experimentales: 10 mL de agua Milli-Q enriquecida (22 µg/L de cada plaguicida), 52 mg de [C₆MIm][PF₆] en 500 µL de metanol, 15 minutos de centrifugación a 4000 rpm y (A) 0% (p/v) de NaCl, (B) pH 6. Restantes condiciones experimentales: ver Figura IV.5.2.

En lo que respecta al tiempo de extracción, tras realizar ensayos aumentando este parámetro hasta 25 minutos pudo comprobarse que, en general, los porcentajes de recuperación de los plaguicidas no experimentaban variación alguna, por lo que se consideró factible el centrifugar la mezcla inmediatamente después de inyectar la disolución del líquido iónico y metanol en la muestra y, por tanto, se decidió no incluir dicho parámetro en el diseño experimental. El tiempo de centrifugación fue otro factor a tener en cuenta, ya que puede influir en la separación de la mezcla y, por tanto, en la eficacia de la extracción. Por esta razón se modificó dicho parámetro entre 10 y 25 minutos, observando un ligero aumento de los porcentajes de recuperación hasta los 20 minutos, valor que se tomó para las siguientes experiencias. En cuanto a la temperatura de extracción, se llevaron a cabo ensayos a 30, 40 y 60°C mostrando que temperaturas superiores a la temperatura ambiente favorecían la solubilidad del líquido iónico en la muestra dificultando, por tanto, la separación de fases y la extracción de los plaguicidas. Por ello, todas las extracciones se realizaron a temperatura ambiente.

Otros parámetros que influyen directamente en la extracción de los plaguicidas son la cantidad de líquido iónico y el tipo y volumen de disolvente dispersor. En lo que respecta a la cantidad de líquido iónico (que fue evaluada disolviendo 52, 65 y 78 mg del mismo en 500 μ L de metanol), se observó que, en principio, los porcentajes de recuperación aumentaban ligeramente al incrementarse la cantidad de líquido iónico. En cuanto al tipo de disolvente dispersor, además del metanol se probó la acetona, ya que junto con el acetonitrilo son los más comunes en DLLME y, además, ya habían dado resultados satisfactorios en estudios similares realizados anteriormente para el análisis de insecticidas en aguas (Berijani y col., 2006; Liu y col., 2009). Sin embargo, en este caso la acetona no resultó ser buen disolvente dispersor, ya que su utilización dio lugar a recuperaciones bastante bajas (entre el 22 y 64%). Por su parte, el acetonitrilo no se utilizó porque forma un sistema perfectamente miscible con el líquido iónico y la muestra acuosa. Por tanto, se seleccionó el metanol como mejor disolvente dispersor. A continuación, se realizaron extracciones utilizando diferentes volúmenes de metanol (300, 500, 650, 800 y 1000 μ L) con una cantidad constante de líquido iónico (78 mg). La Figura IV.5.5 muestra los resultados de ese estudio,

pudiendo apreciarse que los porcentajes de recuperación más altos (entre el 60 y 102%) estaban asociados a valores intermedios de volumen (500 y 650 μL).

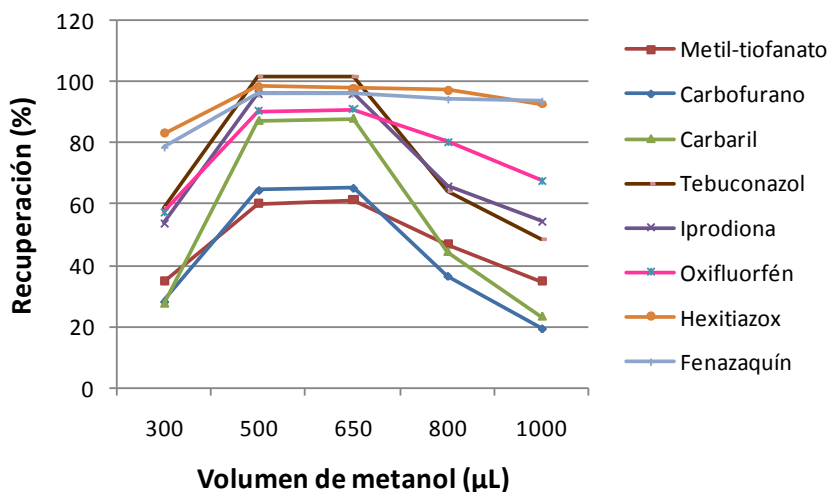


Figura IV.5.5 Influencia del volumen de metanol en la extracción de los ocho plaguicidas de agua Milli-Q. Condiciones experimentales: 10 mL de agua Milli-Q enriquecida (22 $\mu\text{g/L}$ de cada plaguicida) a pH 6,0 y con un 25% (p/v) de NaCl, 78 mg de $[\text{C}_6\text{MIm}][\text{PF}_6]$ en metanol y 20 minutos de centrifugación a 4000 rpm. Restantes condiciones experimentales: ver Figura IV.5.2.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en estos estudios iniciales, se decidió utilizar un diseño experimental del tipo diseño compuesto centrado con cuatro factores (pH de la muestra, porcentaje de NaCl, cantidad de líquido iónico y volumen de metanol), cuyos niveles se muestran en la Tabla IV.5.5. Estos niveles se seleccionaron teniendo en cuenta las experiencias preliminares realizadas y estudios de la bibliografía sobre la extracción de plaguicidas por DLLME (Zhou y col., 2008a; Liu y col., 2009). Los 27 experimentos resultantes se llevaron a cabo utilizando muestras de 10 mL de agua Milli-Q enriquecidas con los ocho plaguicidas (22 $\mu\text{g/L}$ de cada uno), manteniendo constante la temperatura de extracción (temperatura ambiente), el tiempo de centrifugación (20 minutos) y el tipo de disolvente dispersor (metanol). Una vez realizados estos experimentos, se calcularon los porcentajes de recuperación de cada plaguicida y se introdujeron individualmente en el programa *StatGraphics Plus 5.1* para obtener las condiciones óptimas de extracción y las correspondientes superficies de respuesta. Los resultados del análisis del diseño experimental para cada plaguicida mostraron que,

en general, existe una relación directa entre el porcentaje de NaCl y las recuperaciones para la mayoría de los analitos, pues altos porcentajes de NaCl dieron lugar a recuperaciones elevadas. Todo lo contrario sucede en el caso del pH, cuya disminución permite obtener, en general, mayores porcentajes de recuperación. También puede asumirse que, en general, un incremento de la cantidad de líquido iónico aumenta la extracción de todos los plaguicidas, a excepción del oxifluorfen, hexitiazox y fenazaquín. En lo que respecta al volumen de metanol, un aumento del mismo mejora los porcentajes de recuperación, hasta llegar a un cierto valor máximo a partir del cual comienzan a disminuir. Estas observaciones se encuentran en concordancia con las obtenidas anteriormente en las experiencias preliminares. Sin embargo, la complejidad de desarrollar la extracción simultánea de plaguicidas con propiedades diferentes hizo necesaria la elección de las recuperaciones promedio como función respuesta y sus resultados fueron evaluados de nuevo con el programa *StatGraphics Plus 5.1*.

Tabla IV.5.5 Parámetros de la extracción y niveles de los factores utilizados en el diseño compuesto centrado.

Factor	Diseño compuesto centrado			
	Diseño factorial completo		Diseño en estrella	
	Nivel bajo	Nivel alto	Nivel bajo	Nivel alto
pH	3,5	6,5	2,7	7,3
Porcentaje de NaCl	6,0	24,0	1,1	28,9
Cantidad de [C ₆ MIm][PF ₆] (mg)	52	85	43	93
Volumen de metanol (μL)	400	800	291	909

En la Figura IV.5.6 puede apreciarse que los mayores porcentajes de recuperación se obtenían a pHs bajos, volúmenes de metanol intermedios-altos, así como cantidades de líquido iónico y porcentajes de NaCl altos. Por su parte, la Figura IV.5.7 muestra las superficies de respuesta del proceso de extracción en este último caso (seleccionando el porcentaje de recuperación promedio como respuesta). De acuerdo con el programa, la combinación de factores que proporciona la mayor respuesta seleccionada fue la siguiente: pH 2,7, 28,9% (p/v) de NaCl, 88 mg de [C₆MIm][PF₆] y 714 μL de metanol. Cuando se llevó a cabo la extracción bajo las condiciones óptimas se comprobó que, efectivamente, estas condiciones propor-

cionaban las mayores recuperaciones para todos los plaguicidas (porcentajes de recuperación en el intervalo 68-99%). A pesar de ello, se realizaron otros experimentos variando cada factor ligeramente en la zona del óptimo. En concreto, se modificó el pH (valores 2 y 3) y el porcentaje de NaCl (30%) y pudo comprobarse que ninguno de estos valores mejoraba las extracciones de los analitos.

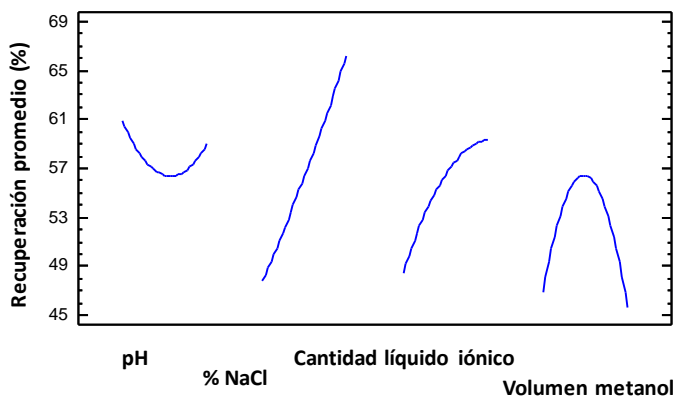


Figura IV.5.6 Principales efectos de los factores que influyen en el procedimiento de DLLME sobre el porcentaje de recuperación promedio de los plaguicidas.

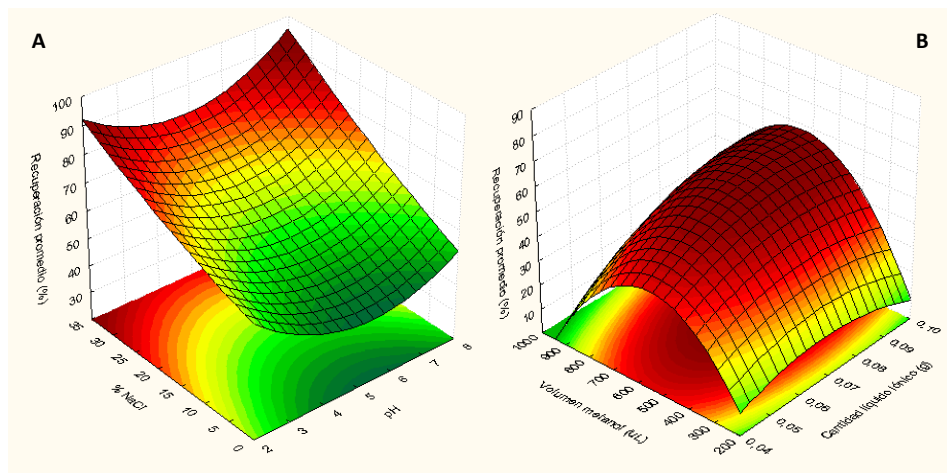


Figura IV.5.7 Superficies de respuesta estimadas para el diseño compuesto centrado. (A) Porcentajes de recuperación promedio frente al porcentaje de NaCl y al pH. (B) Porcentajes de recuperación promedio frente al volumen de metanol y a la cantidad de líquido iónico.

La repetibilidad del método desarrollado fue evaluada llevando a cabo cinco extracciones de 10 mL de agua Milli-Q enriquecida con los ocho plaguicidas a tres niveles diferentes de concentración. En la Tabla IV.5.6 se muestran los resultados de estos estudios, en términos de porcentajes de recuperación promedio (n=5), porcentajes de la RSD y LODs obtenidos para cada plaguicida, así como, los niveles de concentración correspondientes. Como puede apreciarse, los porcentajes de recuperación estuvieron comprendidos entre el 66% (metiltiofanato) y el 101% (hexitiazox) y los LODs entre 0,250 µg/L (carbaril) y 3,86 µg/L (tebuconazol).

Tabla IV.5.6 Porcentajes de recuperación promedio (n=5), porcentajes de la RSD y LODs del procedimiento DLLME-HPLC-DAD aplicado a muestras de agua Milli-Q.

Plaguicida	Nivel ^a (µg/L)	R ^b (%)	RSD (%)	LOD (µg/L)	Plaguicida	Nivel ^a (µg/L)	R ^b (%)	RSD (%)	LOD (µg/L)
Metil- tiofanato	3,05	66	3,2	2,20	Iprodiona	2,07	78	5,2	1,99
	76,3	68	7,3	51,6		88	2,2		
	171	70	7,7	116		84	6,6		
Carbofurano	4,86	70	2,1	3,08	Oxifluorfén	2,00	85	3,5	1,15
	121	71	3,2	50,0		92	3,6		
	272	73	3,7	112		90	3,8		
Carbaril	0,508	71	3,3	0,250	Hexitiazox	4,48	98	1,3	2,48
	12,7	78	3,0	112		101	2,5		
	28,5	73	1,6	251		98	3,5		
Tebuconazol	6,10	93	2,5	3,86	Fenazaquín	2,16	90	2,3	1,79
	152	98	5,0	53,9		93	4,3		
	341	97	5,0	121		90	1,8		

^a Nivel de concentración enriquecido. ^b R: Porcentaje de recuperación promedio.

La Figura IV.5.8 muestra los cromatogramas obtenidos tras la extracción de una muestra de agua Milli-Q enriquecida con los plaguicidas de estudio, bajo las condiciones de extracción óptimas y teniendo en cuenta las longitudes de onda máximas para cada analito. Se observa claramente un pico muy ancho correspondiente al líquido iónico y también diversos picos asociados, probablemente, a impurezas del propio líquido iónico que, además, resultaron ser mayores a valores bajos de pH. Se puede apreciar, también, que a medida que aumenta la longitud de onda, disminuye la absorción de estas interferencias, sin

impedir la correcta identificación y cuantificación de los ocho plaguicidas a sus longitudes de onda correspondientes. Es indudable que sería muy interesante disponer de un detector altamente selectivo y específico, como es el detector de MS, para caracterizar todos estos compuestos interferentes y poder obtener mayor información analítica aunque, como se ha señalado, estos picos no suponen impedimento en la identificación y cuantificación de los plaguicidas seleccionados.

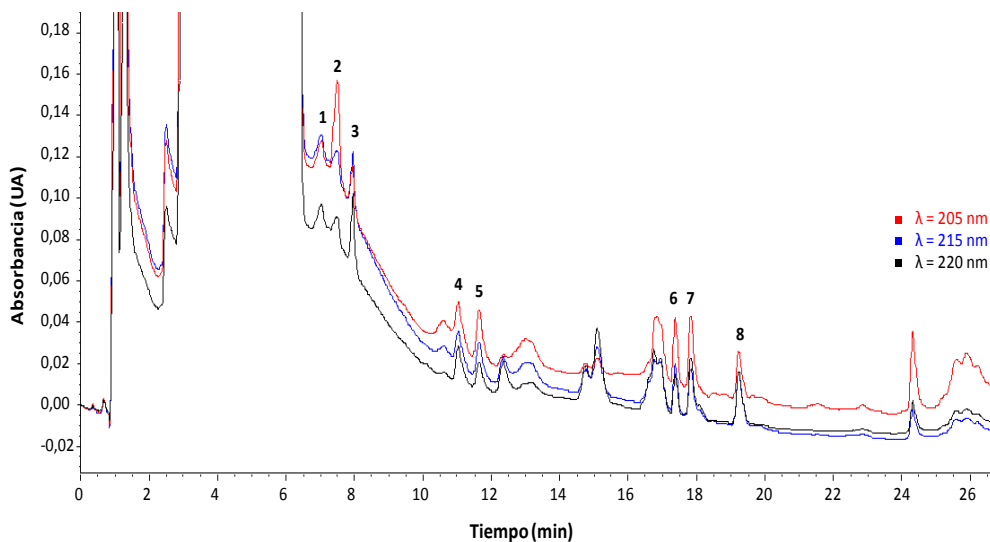


Figura IV.5.8 Cromatogramas obtenidos tras aplicar el método DLLME-HPLC-DAD optimizado a una muestra de 10 mL de agua Milli-Q enriquecida con los ocho analitos, teniendo en cuenta las longitudes de onda de máxima absorción. Condiciones óptimas de la extracción: pH 2,7, 28,9% (p/v) de NaCl, 88 mg de $[C_6MIm][PF_6]$ y 714 μ L de metanol. Muestra: (1) Metil-tiofanato (76,3 μ g/L), (2) carbofurano (121 μ g/L), (3) carbaril (12,7 μ g/L), (4) tebuconazol (152 μ g/L), (5) iprodiona (51,6 μ g/L), (6) oxifluorfen (50 μ g/L), (7) hexitiazox (112 μ g/L) y (8) fenazaquin (53,9 μ g/L). Restantes condiciones experimentales: ver Figura IV.5.2.

IV.5.4 DLLME-HPLC-DAD de muestras de plátano

Una vez optimizado el procedimiento de extracción, se aplicó la metodología DLLME-HPLC-DAD desarrollada al análisis de muestras de plátano. Para ello, fue necesario incorporar una etapa de extracción asistida por ultrasonidos previa a la DLLME, utilizando un disolvente orgánico adecuado. Con este objetivo se realizaron extracciones, por duplicado, de muestras de 5 g de plátano ecológico homogeneizado y enriquecido con todos los plaguicidas a una concentración de 50 μ g/kg. La influencia del disolvente orgánico en la extracción

por ultrasonidos se evaluó empleando volúmenes de 5 y 10 mL de acetonitrilo y acetona, ya que los ocho analitos presentan una elevada solubilidad en ellos y, además, son muy utilizados para la extracción de plaguicidas de frutas (Fillion y col., 2000; Pang y col., 2006b; Juan-García y col., 2007). Cada una de las experiencias se realizó introduciendo la muestra de plátano con el correspondiente disolvente en un baño de ultrasonidos durante 5 minutos. Seguidamente, se centrifugó la mezcla a 4000 rpm durante 5 minutos y se filtró el sobrenadante con filtros de 0,45 μm (Chromafil® Xtra PET-45/25 de poliéster). El extracto resultante se evaporó hasta sequedad en rotavapor a 40°C (a 205 y 500 mbar para acetonitrilo y acetona, respectivamente), el residuo se disolvió en 10 mL de agua Milli-Q con un 28,9% (p/v) de NaCl, a pH 2,7 (ajustado con HCl 1,0 M) y se aplicó el procedimiento de DLLME descrito: adición inmediata de 88 mg de $[\text{C}_6\text{MIm}][\text{PF}_6]$ disueltos en 714 μL de metanol, centrifugación a 4000 rpm durante 20 minutos y redisolución de la fase orgánica sedimentada, 20 μL , en acetonitrilo hasta un volumen final de 125 μL .

La Figura IV.5.9 muestra los resultados de la influencia del tipo y volumen de disolvente orgánico (expresados como porcentajes de recuperación). Puede apreciarse que todas las condiciones experimentales ensayadas proporcionaron porcentajes de recuperación bajos (entre 19 y 48% para el acetonitrilo y entre el 8 y 28% para las extracciones con acetona), por lo que fue necesario modificar dicho procedimiento. Para ello, se adicionó a la muestra, además del acetonitrilo, diferentes sales (MgSO_4 , NaCl, citrato disódico sesquihidratado y citrato trisódico dihidratado), lo que produce el calentamiento de la misma así como un efecto de *salting-out* importante, tal como proponen diversos autores en otros procedimientos de extracción de plaguicidas de frutas y verduras (Anastassiades y col., 2003; Payá y col., 2007; Krueve y col., 2008; Lesueur y col., 2008b). La adición de estas sales en cantidades adecuadas, generalmente 4, 1, 0,5 y 1 g, respectivamente, para 10 g de muestra, junto con el disolvente orgánico (normalmente acetonitrilo, 10 mL), favorece la separación de fases y la extracción de plaguicidas. De hecho, si bien la adición de NaCl favorece el efecto *salting-out* y el MgSO_4 reduce la fase acuosa de la muestra (mejorando, por tanto, las recuperaciones de los analitos al favorecer la partición líquido-líquido, Lehotay, 2007), los citratos generan un tampón adecuado para la partición líquido-líquido, de pH entre 5 y 5,5, rango en el

cual la mayor parte de los plaguicidas son suficientemente estables a ácidos y bases (Anastassiades y col., 2007).

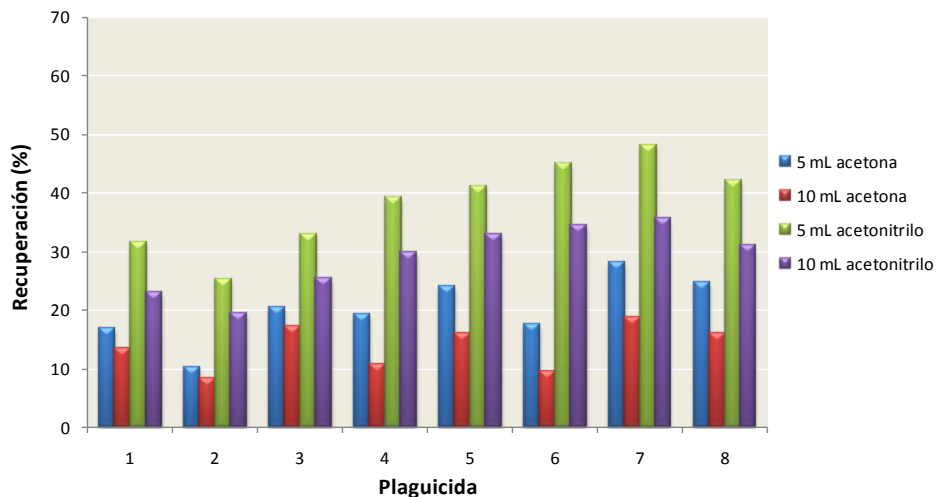


Figura IV.5.9 Influencia del tipo y volumen de disolvente orgánico (acetonitrilo y acetona) en la extracción de los ocho plaguicidas de 5 g de plátano ecológico. Extracción asistida por ultrasonidos previa a la DLLME con 5 y 10 mL de disolvente durante 5 minutos. Muestra: 50 µg/kg de cada plaguicida. Identificación y restantes condiciones experimentales: ver Figuras IV.5.2 y VI.5.8.

Teniendo en cuenta todas estas consideraciones, se llevaron a cabo diferentes experiencias manteniendo la misma proporción de las cantidades de cada reactivo sólido y del volumen de disolvente orgánico previamente descrito en la bibliografía: 5 g de muestra homogeneizada, 5 mL de acetonitrilo, 2 g de $MgSO_4$, 0,5 g de NaCl, 0,25 g de citrato disódico sesquihidratado y 0,5 g de citrato trisódico dihidratado. Bajo estas condiciones de extracción, se pudo comprobar que los porcentajes de recuperación no mejoraban respecto de la utilización de acetonitrilo sin ninguna sal (Figura IV.5.9). Por esta razón, se decidió tomar una cantidad inferior de muestra, concretamente 1 g, y realizar extracciones con las mismas cantidades y volumen descritos en la bibliografía (10 mL de acetonitrilo, 4 g de $MgSO_4$, 1 g de NaCl, 0,5 g de citrato disódico sesquihidratado y 1 g de citrato trisódico dihidratado). También se realizaron extracciones con la mitad de estos reactivos, con objeto de comparar los resultados. En ambos casos los porcentajes de recuperación fueron similares y, además, considerablemente mayores que los obtenidos sin el empleo de sales (entre el 56 y 94%). Además, con el fin de mejorar la sensibilidad, se aumentó la cantidad de muestra (2 g), pero las recuperaciones

disminuyeron. También se utilizó la acetona como disolvente de extracción bajo las mejores condiciones obtenidas hasta el momento (1 g de plátano, 5 mL de disolvente, 2 g de MgSO_4 , 0,5 g de NaCl, 0,25 g de citrato disódico sesquihidratado y 0,5 g de citrato trisódico dihidratado). Sin embargo, no mejoró la extracción de ninguno de los ocho analitos, probablemente debido al hecho de que la acetona es bastante miscible con el agua y, además favorece, en mayor medida que el acetonitrilo, la coextracción de lípidos, azúcares y otros compuestos de la matriz del plátano (Lehotay y col., 2001; Anastassiades y col., 2003). Los resultados de todas estas experiencias se muestran en la Figura IV.5.10, en la que se observa claramente que las mejores condiciones de extracción con ultrasonidos eran: 1 g de plátano, 5 mL de acetonitrilo, 2 g de MgSO_4 , 0,5 g de NaCl, 0,25 g de citrato disódico sesquihidratado y 0,5 g de citrato trisódico dihidratado.

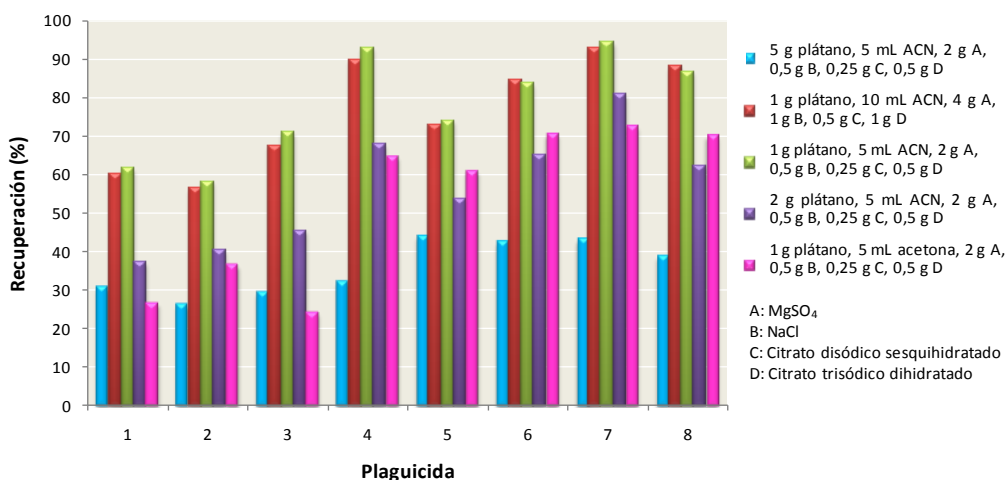


Figura IV.5.10 Influencia de la adición de sales (MgSO_4 , NaCl, citrato disódico sesquihidratado y citrato trisódico dihidratado) en la extracción de los ocho plaguicidas de muestras de plátano ecológico. Extracción asistida por ultrasonidos previa a la DLLME durante 5 minutos. Muestra: 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de cada plaguicida. Identificación y restantes condiciones experimentales: ver Figuras IV.5.2 y VI.5.8.

IV.5.4.1 Validación del método

La validación de la metodología desarrollada para muestras de plátano fue llevada a cabo a partir de los correspondientes estudios de calibración, recuperación, precisión y exactitud. Para ello, inicialmente se realizaron extracciones de muestras de plátano ecológico no enriquecidas con objeto de

evaluar la presencia o ausencia de los ocho analitos en estudio y, por tanto, para determinar si era posible utilizarlas para dichos estudios de validación. Fruto de estas experiencias se comprobó que ninguna de las muestras contenía residuos de dichos compuestos ni interferencias de la matriz que dificultaran su correcta cuantificación a las longitudes de onda máximas de cada analito, por lo que se podían utilizar para llevar a cabo los estudios de validación que se describen a continuación.

Teniendo en cuenta que las muestras de plátano presentan una matriz muy compleja, es de gran interés estudiar el efecto matriz de dichas muestras en la calibración, a partir de la comparación estadística entre las rectas de calibrado de los estándares (Tabla IV.5.4) y las de los extractos de la DLLME enriquecidos (calibrado con la matriz), ambos disueltos en acetonitrilo. Con este propósito, se realizaron extracciones de muestras de plátano de acuerdo con las condiciones anteriormente descritas y se enriqueció el extracto final con los ocho plaguicidas a distintos niveles de concentración ($n=7$), comprendidos en el rango 0,010-6,83 mg/L, inyectando tres veces cada concentración. En la Tabla IV.5.7 se pueden observar los resultados de estos estudios (basados en áreas de pico), concretamente los rangos de concentración estudiados, los parámetros estadísticos calculados a partir de la regresión de mínimos cuadrados y la evaluación del efecto matriz en cada caso. Puede apreciarse que para todos los plaguicidas se obtuvo una buena linealidad, con coeficientes de correlación (R) superiores a 0,997. También se observó que existía un fuerte efecto matriz para la mayoría de los plaguicidas en las muestras de plátano, como mostró la comparación estadística entre las pendientes y las ordenadas en el origen del calibrado con la matriz y de los estándares disueltos en acetonitrilo (que se presentaron en la Tabla IV.5.4), ya que para todos los plaguicidas, a excepción del hexitiazox, existían diferencias significativas entre ellas (valores de p menores o iguales a 0,1, Tabla IV.5.7). Por tanto, fue necesario utilizar el calibrado con la matriz para cuantificar todos los plaguicidas en las muestras de plátano.

Tabla IV.5.7 Datos del calibrado con la matriz y resultados de la evaluación del efecto matriz.

Plaguicida	Rango (mg/L)*	b (S _b)	a (S _a)	R	Efecto matriz**
Metil-tiofanato	0,061-3,42	7,91x10 ⁴ (1336)	962 (2469)	0,999	Sí
Carbofurano	0,097-5,44	9,76x10 ⁴ (1819)	2788 (5343)	0,997	Sí
Carbaril	0,010-1,02	4,28x10 ⁵ (6520)	-1997 (3179)	0,999	Sí
Tebuconazol	0,122-6,83	2,14x10 ⁴ (376)	-1096 (1386)	0,999	Sí
Iprodiona	0,041-2,31	1,15x10 ⁵ (2031)	-1906 (2537)	0,998	Sí
Oxifluorfen	0,040-2,24	1,20x10 ⁵ (1603)	788 (1938)	0,997	Sí
Hexitiazox	0,089-5,01	5,61x10 ⁴ (1401)	979 (3793)	0,998	No
Fenazaquín	0,043-2,42	1,17x10 ⁵ (1692)	1409 (2209)	0,999	Sí

b: pendiente; S_b: desviación estándar de la pendiente; a: ordenada en el origen; S_a: desviación estándar de la ordenada en el origen, R: coeficiente de correlación.

* Rango de concentración estudiado (mg/L).

** Se considera diferencia estadística cuando los valores *p* de la comparación entre las ordenadas en el origen o entre las pendientes son ≤0,1.

Para el estudio de recuperaciones se llevaron a cabo cinco extracciones consecutivas (n=5) de muestras de plátano ecológico enriquecidas a tres niveles diferentes de concentración, uno de ellos correspondiente al LMR de cada analito. La Tabla IV.5.8 muestra los resultados de este estudio así como los correspondientes niveles de concentración. Puede observarse que los porcentajes de recuperación promedio oscilaban entre el 53% para carbofurano y el 97% para hexitiazox, con porcentajes de RSD por debajo del 8,7% en todos los casos. Por su parte, los LODs del método alcanzaron niveles comprendidos entre 0,320 y 4,66 µg/kg para carbaril y tebuconazol, respectivamente, ver Tabla IV.5.8, niveles que se encuentran por debajo de los LMRs establecidos por la legislación de la UE para estos plaguicidas en plátanos.

En lo que respecta a los trabajos publicados en la bibliografía, hasta el momento únicamente se han encontrado dos en los que la DLLME se utilice para la extracción de plaguicidas de frutas (Zhao y col., 2007; Zang y col., 2008), aunque en ninguno de ellos se analizaron los del presente estudio ni se empleó la técnica HPLC. De hecho, en el trabajo llevado a cabo por Zhao y col. (2007), se determinaron etoprofos, metil-paratión, fenitrotión, malatión, clorpirifos y

profenofos en sandía por GC-FPD mientras que, en el estudio realizado por Zang y col. (2008), se analizaron captan, folpet y captafol en manzana por GC-ECD. Los porcentajes de recuperación obtenidos estuvieron comprendidos en los intervalos 67-111% y 93-110%, respectivamente, y los LODs del método en los rangos 0,10-0,19 y 3-8 µg/kg, respectivamente.

Tabla IV.5.8 Porcentajes de recuperación promedio (n=5), porcentajes de la RSD y LODs del procedimiento DLLME-HPLC-DAD aplicado a muestras de plátano.

Plaguicida	Nivel ^a (µg/kg)	R ^b (%)	RSD (%)	LOD (µg/kg)	Plaguicida	Nivel ^a (µg/kg)	R ^b (%)	RSD (%)	LOD (µg/kg)
Metil-tiofanato	7,63	59	7,9	3,92	Iprodiona	5,16	71	2,9	2,20
	100	61	7,3	20,0		75	3,9		
	150	63	5,1	30,0		78	8,7		
Carbofurano	12,1	53	2,6	4,03	Oxifluorfén	5,00	82	3,4	1,35
	20,0	56	3,2	50,0		84	6,9		
	30,0	62	6,6	75,0		85	2,9		
Carbaril	1,27	69	2,7	0,320	Hexitiazox	11,2	92	5,1	2,98
	50,0	70	2,8	500		94	4,7		
	75,0	71	5,7	625		97	3,7		
Tebuconazol	15,2	89	8,6	4,66	Fenazaquín	5,39	83	2,6	2,14
	50,0	93	5,0	200		86	4,3		
	75,0	96	3,1	300		89	2,8		

^a Nivel de concentración enriquecido. ^b R: Porcentaje de recuperación promedio.

Existen, además, muy pocos trabajos en la bibliografía sobre el análisis de plaguicidas en plátanos por HPLC (Aharonson y col., 1994; Barnes y col., 1997; Pawlowski y Poole, 1998; Veneziano y col., 2004; Grimalt y col., 2007). Únicamente en tres de estos estudios se ha analizado uno de estos ocho plaguicidas, concretamente el metil-tiofanato (Aharonson y col., 1994; Veneziano y col., 2004) y el hexitiazox (Grimalt y col., 2007). Aharonson y col. (1994), por su parte, determinaron tiabendazol, carbendazima y metil-tiofanato por HPLC-UV tras extracción con fluidos supercríticos. Los porcentajes de recuperación obtenidos oscilaban entre 78 y 85% y los LODs entre 1,2 y 300 µg/kg. Por otro lado, Grimalt y col. (2007), analizaron buprofezín y hexitiazox en plátano por HPLC-MS/MS tras extracción sólido-líquido con acetona. Las recuperaciones obtenidas en este estudio oscilaron entre 84 y 127% (97 y 127% para el hexitiazox). Veneziano y col.

(2004) determinaron también metil-tiofanato junto con benomilo, carbendazima y tiabendazol, tras su extracción por SPE y posterior determinación por HPLC-DAD. En este caso, los porcentajes de recuperación variaron entre el 81 y el 96% para todos los plaguicidas, de 63 a 70% para metil-tiofanato, y los LODs entre 1 y 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$. A la vista de estos estudios y teniendo en cuenta los resultados mostrados en la Tabla IV.5.8 se puede apreciar que, en general, los porcentajes de recuperación promedio y los LODs obtenidos en este estudio son comparables con los anteriores.

Para los estudios de precisión y exactitud se realizaron cinco extracciones consecutivas ($n=5$) de las muestras de plátano ecológico enriquecidas a tres niveles diferentes de concentración, uno de ellos correspondiente una vez más al LMR de cada analito y los otros dos niveles por encima y por debajo de dichos valores, Tabla IV.5.9. Tras realizar la prueba *t-Student* (Miller y Miller, 2002), se pudo comprobar que para todos los plaguicidas los valores experimentales del estadístico *t* fueron inferiores al valor tabulado (2,78 para $n=5$), a un nivel de confianza del 95%, por lo que se puede aceptar la hipótesis nula (no se observan diferencias significativas entre el valor real y el experimental). En la Tabla IV.5.9 también se muestran los porcentajes de recuperación aparentes (relación entre concentración encontrada y concentración añadida), que resultaron comprendidos entre 92 y 106%.

La Figura IV.5.11 muestra los cromatogramas obtenidos tras aplicar el método DLLME-HPLC-DAD a una muestra de plátano ecológico enriquecida (A) y no enriquecida (B). Puede observarse que, a pesar de las diversas interferencias presentes, es posible identificar y cuantificar correctamente los ocho plaguicidas, como muestran los correspondientes cromatogramas, y puede apreciarse, también, que la muestra analizada no contenía ninguno de los plaguicidas en estudio, Figura IV.5.11B.

Tabla IV.5.9 Resultados del estudio de precisión y exactitud del método desarrollado para la cuantificación de los ocho plaguicidas en muestras de plátano.

Plaguicida	Añadida ($\mu\text{g}/\text{kg}$) ^a	Encontrada ($\mu\text{g}/\text{kg}$) ^b	Recuperación (%) ^c	t
Metil-tiofanato	50,0	48,9 \pm 1,6	98	0,16
	100	92,4 \pm 3,8	92	1,64
	125	117 \pm 22	93	1,22
Carbofurano	16,0	15,0 \pm 0,9	94	1,51
	20,0	19,6 \pm 1,7	98	0,75
	25,0	24,0 \pm 1,5	96	1,26
Carbaril	24,0	23,9 \pm 2,1	100	0,09
	50,0	49,0 \pm 6,3	98	0,12
	62,0	60,0 \pm 7,4	97	1,13
Tebuconazol	30,0	29,8 \pm 3,6	99	0,18
	50,0	48,8 \pm 5,5	98	1,15
	62,0	61,1 \pm 4,8	98	0,62
Iprodiona	10,0	10,3 \pm 1,1	103	2,33
	20,0	20,1 \pm 2,6	101	0,19
	25,0	24,1 \pm 3,2	96	1,29
Oxifluorfén	22,0	22,4 \pm 2,8	102	1,63
	50,0	49,2 \pm 4,9	98	1,42
	62,0	61,2 \pm 3,8	99	0,96
Hexitiazox	250	253 \pm 14	101	2,50
	500	481 \pm 29	96	2,72
	575	608 \pm 41	106	2,49
Fenazaquín	100	98,3 \pm 9,9	98	0,65
	200	206 \pm 17	103	2,05
	250	263 \pm 20	105	2,29

^a Concentración añadida; ^b Concentración encontrada: valor medio \pm desviación estándar de cinco determinaciones a un nivel de confianza del 95%; ^c Porcentaje de recuperación aparente.

IV.5.5 Análisis de diferentes muestras de plátano comerciales

La metodología analítica previamente desarrollada y validada se aplicó, finalmente, al análisis de nueve muestras de plátano comerciales procedentes de cultivos regionales, tres muestras de plátano ecológico, mientras que las seis restantes procedían de cultivos no ecológicos (Tabla IV.5.10).

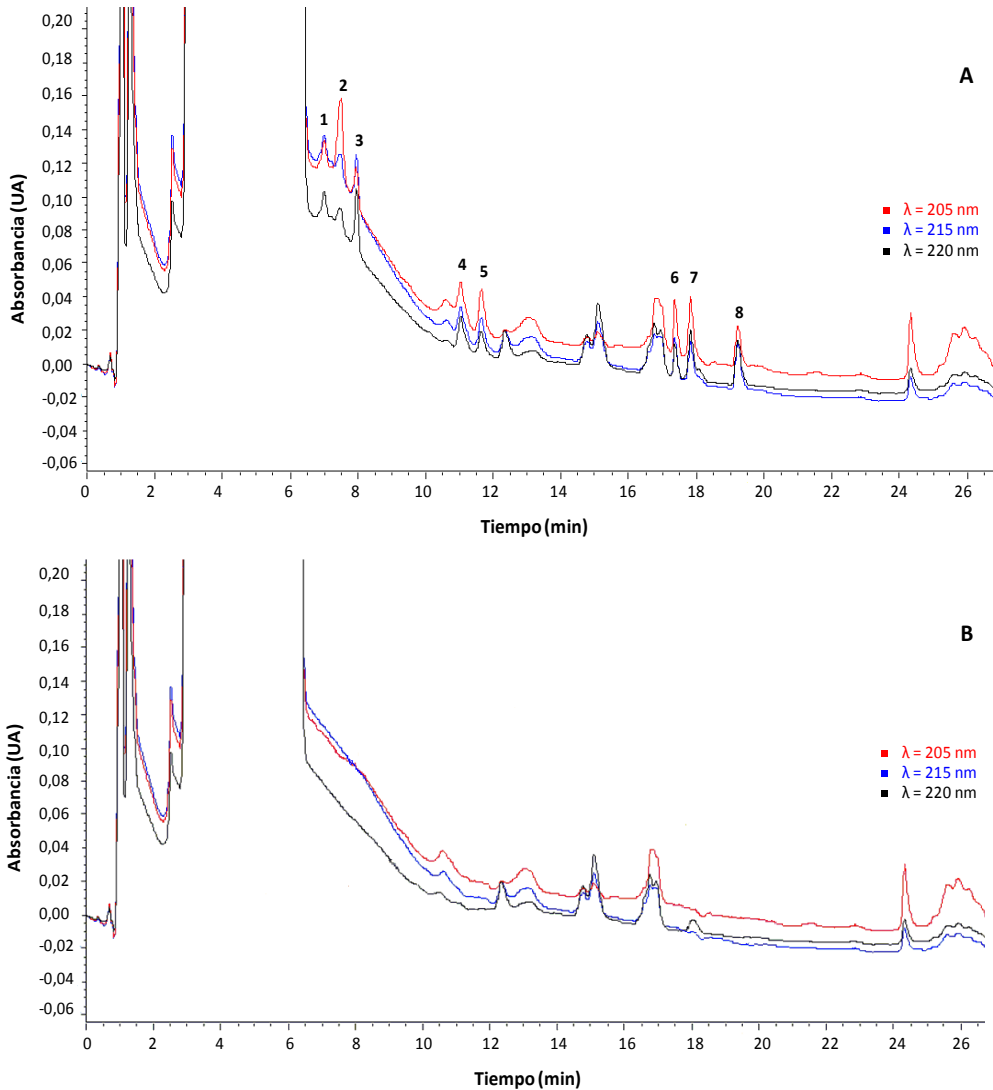


Figura IV.5.11 Cromatogramas obtenidos tras la extracción de una muestra de 1 g de plátano ecológico enriquecida (A) y sin enriquecer (B), siguiendo el procedimiento DLLME-HPLC-DAD desarrollado. Muestra: (1) Metil-tiofanato (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$), (2) carbofurano (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$), (3) carbaril (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$), (4) tebuconazol (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$), (5) iprodiona (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$), (6) oxifluorfén (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$), (7) hexitiazox (500 $\mu\text{g}/\text{kg}$) y (8) fenazaquín (200 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Restantes condiciones experimentales: ver Figuras IV.5.2. y IV.5.8.

Cada extracción se realizó tomando 1 g de muestra obtenida tras la homogeneización de 10 plátanos (aproximadamente 1 kg), como indica el RD 290/2003 de 7 de marzo (BOE nº 58 de 8 de marzo de 2003), por el que se establecen los métodos de muestreo para el control de residuos de plaguicidas en productos de origen vegetal y animal.

Una vez realizados los correspondientes análisis, se observó que cinco de las nueve muestras analizadas, procedentes de cultivos no ecológicos, presentaban residuos de alguno de los plaguicidas en estudio, concretamente carbofurano y carbaril. En particular, se encontró que sólo dos muestras contenían residuos de ambos plaguicidas (muestras nº 6 y 8), mientras que las tres restantes únicamente uno de ellos: carbofurano, en la muestra nº 4 y carbaril, en las muestras nº 5 y 9. Además, en todos los casos las concentraciones de estos plaguicidas estuvieron comprendidas entre 14 µg/kg (carbofurano, muestra nº 6) y 23 µg/kg (carbaril, muestra nº 5), valores inferiores a los LMRs establecidos en estas matrices (según la UE, 0,02 y 0,05 mg/kg, respectivamente).

Tabla IV.5.10 Resultados de la aplicación del método desarrollado al análisis de muestras de plátano.

Muestra	Tipo de cultivo	Procedencia	Plaguicida detectado	Concentración (µg/kg)
1	Ecológico	Tacoronte (Tenerife)	-	-
2	Ecológico	La Laguna (Tenerife)	-	-
3	Ecológico	La Laguna (Tenerife)	-	-
4	No ecológico	Puerto de la Cruz (Tenerife)	Carbofurano	16 ± 2
5	No ecológico	La Orotava (Tenerife)	Carbaril	23 ± 3
6	No ecológico	La Laguna (Tenerife)	Carbofurano	14 ± 0,9
			Carbaril	18 ± 1
7	No ecológico	Granadilla (Tenerife)	-	-
8	No ecológico	La Laguna (Tenerife)	Carbofurano	<LOQ
			Carbaril	21 ± 0,8
9	No ecológico	Güímar (Tenerife)	Carbaril	<LOQ

La Figura IV.5.12 muestra los cromatogramas correspondientes a la muestra nº 6. Puede apreciarse claramente la presencia de carbofurano y carbaril, cuyos máximos de absorción corresponden a las longitudes de onda 205 y 220 nm, respectivamente. La identificación de estos plaguicidas fue confirmada comparando los tiempos de retención, enriqueciendo el extracto con cada analito y comparando los espectros de absorción con los de los correspondientes estándares.

Los plaguicidas encontrados en las muestras analizadas, carbofurano y carbaril, son insecticidas (el carbofurano también tiene actividad nematocida) de uso bastante frecuente en las Islas Canarias en el cultivo del plátano. En concreto,

el carbofurano se ha utilizado comúnmente para combatir los ataques de nematodos, que están siempre presentes en las raíces de la platanera, o bien para controlar distintas especies de insectos del suelo y follaje, como el picudo negro y los pulgones, que atacan a los cultivos disminuyendo los rendimientos y la calidad de la producción. Por su parte, el carbaril se ha empleado principalmente para luchar contra las plagas de lagarta, que suelen atacar a las piñas de plátanos. Sin embargo, la comercialización de estos plaguicidas se ha prohibido desde mediados de 2008 (fechas límites de comercialización del carbofurano y del carbaril: 13 de junio de 2008 y 21 de julio de 2008, respectivamente) y su uso no puede extenderse más allá de seis meses desde estas fechas. La presencia de residuos de carbofurano y carbaril en algunas de las muestras se podría justificar porque estos productos quedarán en stock y los agricultores los aplicaran en una fecha posterior a la de su prohibición hasta su completo agotamiento. Sin embargo, dado que ninguna de las muestras analizadas los contenía a niveles superiores a los LMRs establecidos para plátanos por la legislación europea, no pueden ser considerados como un problema de salud pública.

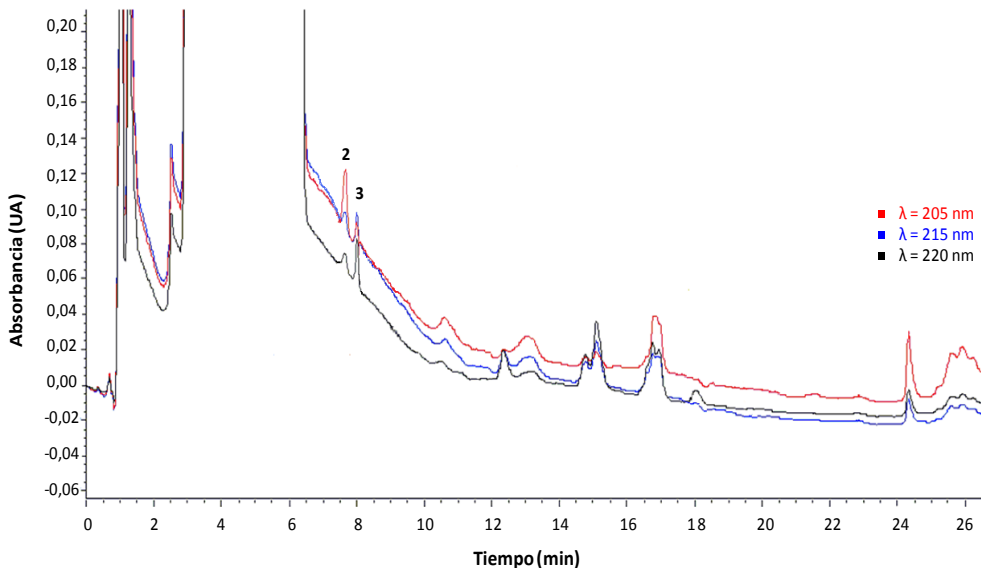


Figura IV.5.12 Cromatogramas de una muestra de plátano (muestra nº 6) tras aplicar el procedimiento DLLME-HPLC-DAD optimizado. Identificación: (2) carbofurano y (3) carbaril.

IV.5.6 Conclusiones

- Se ha puesto a punto una nueva metodología para la determinación de un grupo de ocho plaguicidas muy utilizados en las Islas Canarias en el cultivo del plátano (metil-tiofanato, carbofurano, carbaril, tebuconazol, iprodiona, oxifluorfen, hexitiazox y fenazaquín) mediante DLLME-HPLC-DAD.
- La extracción y preconcentración de la muestra se llevó a cabo utilizando el líquido iónico hexafluorofosfato de 1-hexil-3-metilimidazolio ($[\text{C}_6\text{MIm}][\text{PF}_6]$) como disolvente de extracción en DLLME, por su mayor compatibilidad medioambiental y menor toxicidad respecto de los disolventes orgánicos convencionales. Además, presenta otras ventajas como baja volatilidad, uso de pequeños volúmenes de extracción y alta estabilidad química y térmica.
- El procedimiento de DLLME se optimizó por medio de un diseño experimental, extrayendo una muestra de agua Milli-Q debidamente enriquecida con los plaguicidas de estudio, siendo las condiciones óptimas de extracción las siguientes: 10 mL de muestra con un 28,9% (p/v) de NaCl, pH 2,7, 88 mg de $[\text{C}_6\text{MIm}][\text{PF}_6]$ y 714 μL de metanol.
- Para la extracción de los plaguicidas de las muestras de plátano fue necesario desarrollar un procedimiento de extracción asistida por ultrasonidos previo a la aplicación de la DLLME, haciendo uso de distintos disolventes orgánicos y sales. Las mejores condiciones de extracción resultaron ser: 1 g de plátano, 5 mL de acetonitrilo, 2 g de MgSO_4 , 0,5 g de NaCl, 0,25 g de citrato disódico sesquihidratado y 0,5 g de citrato trisódico dihidratado.
- La comparación de las rectas de calibrado de los analitos disueltos en la matriz de plátano con la del estándar disuelto en acetonitrilo mostró la existencia de un efecto matriz importante para todos los plaguicidas, a excepción del hexitiazox, por lo que fue necesario utilizar un calibrado con la matriz para cuantificar todos los plaguicidas en estas muestras.

- Los LODs alcanzados estuvieron comprendidos entre 0,320 y 4,66 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (carbaril y tebuconazol, respectivamente). Estos valores son inferiores a los correspondientes LMRs establecidos por la legislación europea.
- El método desarrollado presenta una buena precisión, exactitud, selectividad y linealidad en el intervalo de concentración estudiado, por lo que puede utilizarse de forma fiable para el análisis rutinario de plaguicidas en muestras de plátano. Los porcentajes de recuperación obtenidos estuvieron comprendidos entre 53% (carbofurano) y 97% (hexitiazox) para todos los plaguicidas.
- El método se aplicó al análisis de nueve muestras de plátano comerciales procedentes de cultivos regionales, tres ecológicas y seis no ecológicas. En cinco de las muestras analizadas (no ecológicas) se detectó la presencia de residuos de carbofurano y/o carbaril, aunque en todos los casos a niveles inferiores a sus correspondientes LMRs.

5. CONCLUSIONES



V. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en los estudios experimentales descritos en esta Tesis Doctoral, se pueden establecer las siguientes conclusiones generales:

- Se han desarrollado diferentes metodologías analíticas para determinar diversos grupos de plaguicidas de uso habitual en las Islas Canarias, fundamentalmente insecticidas y fungicidas, en aguas minerales, de suministro urbano, de estanque, subterráneas y de escorrentía, así como en muestras de vino, tomates, zumos de frutas (manzana, uva, naranja y piña) y plátanos utilizando GC, HPLC y CE como técnicas analíticas.
- Se han utilizado diferentes técnicas de preconcentración fuera de línea (extracción asistida por ultrasonidos, SPE, SPME y DLLME) para incrementar la sensibilidad y selectividad de las determinaciones analíticas por GC, HPLC y CE.
- Se ha comprobado la utilidad de combinar técnicas de preconcentración en línea (*stacking*) con la CE para mejorar la sensibilidad de las determinaciones analíticas de plaguicidas y alcanzar bajos límites de detección.
- Se ha demostrado la utilidad del uso de nuevas fases estacionarias para SPE, de alta selectividad y capacidad de extracción y bajo coste, como son los MWCNTs, para la extracción de plaguicidas. También se ha puesto de manifiesto la aplicabilidad de los líquidos iónicos como nuevos disolventes de extracción de plaguicidas para DLLME.
- Se ha comprobado la capacidad del diseño experimental como herramienta matemática para la optimización de las condiciones de extracción en SPME y DLLME durante la etapa de preparación de la muestra.
- Las metodologías analíticas desarrolladas se han validado satisfactoriamente a partir de los correspondientes estudios de repetibilidad, calibración, recuperación, precisión y exactitud.

Conclusiones

- Se ha realizado un seguimiento del contenido de diferentes plaguicidas en muestras de agua, vino, tomate, zumo de frutas y plátano de las Islas Canarias, comprobándose que estos alimentos pueden ser consumidos por la población con total seguridad, pues no se encontraron residuos de plaguicidas por encima de los LMRs.

BIBLIOGRAFÍA



- Aharonson, N., Lehotay, S.J., Ibraim, M.A., (1994). *J. Agric. Food Chem.*, **42**, 2817.
- Ahmed, F.E. (2001). *Trends Anal. Chem.*, **20**, 649.
- Albero, B., Sánchez-Brunete, C., Tadeo, J.L., (2003). *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 6915.
- Albero, B., Sánchez-Brunete, C., Tadeo, J.L., (2005). *Talanta*, **66**, 917.
- Albin, M., Grossman, P.D., Moring, S.E., (1993). *Anal. Chem.*, **65**, 489A.
- Al-Degs, Y.S, Al-Ghouti, M.A., (2008). *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, **88**, 487.
- Alpendurada, M.F., (2000). *J. Chromatogr. A*, **889**, 3.
- Al-Saleh, I.A., (1994). *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, **13**, 151.
- Amvrazi, E.G., Albanis, T.A., (2006). *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 9642.
- Anastassiades, M., Lehotay, S.J., Stajnbaher, D., Schenck, F.J., (2003). *J. AOAC Int.*, **86**, 412.
- Anastassiades, M., Tasdelen, B., Scherbaum, E., Stajnbaher, D., (2007). *Recent developments in QuEChERS methodology for pesticide multiresidue analysis*. En: Ohkawa, H. Miyagawa, H., Lee, P.W. (eds.). *Pesticide Chemistry: Crop protection, public health, environmental safety*. Wiley-VCH. Alemania.
- Andreu, V., Picó, Y., (2004). *Trends Anal. Chem.*, **23**, 772.
- Arrebola, F.J., Martínez-Vidal, J.L., González-Rodríguez, M.J., Garrido-Frenich, A., Sánchez-Morito, N., (2003). *J. Chromatogr. A*, **1005**, 131.
- Asperger, A., Efer, J., Koal, T., Engewald, W., (2002). *J. Chromatogr. A*, **960**, 109.
- Baker, S.A., (2007). *J. Biomed. Biophys. Methods*, **70**, 151.
- Banerjee, B.D., Seth, V., Bhattacharya, A., Pasha, S.T., Chakraborty, A.K., (1999). *Toxicol. Lett.*, **107**, 33.
- Barba-Navarro, A., Oliva, J., (2003). *Tecnología del vino*, **10**, 33.

- Barnes, K.A., Fussell, R.J., Startin, J.R., Mobbs, H.J., James, R., Reynolds, S.L., (1997). *Rapid Comm. Mass Spectrom.*, **11**, 159.
- Basheer, C., Alnedhary, A.A., Madhava-Rao, B.S., Valliyaveettil, S., Lee, H.K., (2006). *Anal. Chem.*, **78**, 2853.
- Bélanger, J.M.R., Paré, J.R.J., (2006). *Anal. Bioanal. Chem.*, **386**, 1049.
- Belmonte-Vega, A., Garrido-Frenich, A., Martínez-Vidal, J.L., (2005). *Anal. Chim. Acta*, **538**, 117.
- Beltrán, J., López, F.J., Hernández, F., (2000). *J. Chromatogr. A*, **885**, 389.
- Beltrán, J., Peruga, A., Pitarch, E., López, F.J., Hernández, F., (2003). *Anal. Bioanal. Chem.*, **376**, 502.
- Berijani, S., Assadi, Y., Anbia, M., Milani-Hosseini, M.R., Aghaee, E., (2006). *J. Chromatogr. A*, **1123**, 1.
- Berrada, H., Font, G., Monto, J.C., (2003). *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **33**, 19.
- Berthod, A., Carda-Broch, S., (2003). *CTA*, **24**, 36.
- Beyer, A., Biziuk, M., (2008). *Food Chem.*, **108**, 669.
- Biesaga, M., Pyrzynska, K. (2006). *J. Sep. Sci.*, **29**, 2241.
- Blanco, E., Casais, M.C., Mejuto, M.C., Cela, R., (2006). *Anal. Chem.*, **78**, 2772.
- Blasco, C., Fernández, M., Picó, Y., Font, G., (2004). *J. Chromatogr. A*, **1030**, 77.
- Blasco, C., Font, G., Mañes, J., Picó, Y., (2003). *Anal. Chem.*, **75**, 3606.
- Blum, A., Monir, M., Wirsansky, I., Ben-Arzi, S., (2005). *Europ. J. Internal Medicine*, **16**, 402.
- Bogialli, S., Curini, R., Di Corcia, A., Laganá, A., Mele, M., Nazzari, M., (2004a). *J. Chromatogr. A*, **1054**, 351.
- Bogialli, S., Curini, R., Di Corcia, A., Nazzari, M., Tamburro, D., (2004b). *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 665.

- Brewer, B.N., Armbrust, K.L., Mead, K.T., Holmes, W.E., (2004). *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **18**, 1693.
- Britz-McKibbin, P., Chen, D.Y., (2000). *Anal. Chem.*, **72**, 1242.
- Brossa, L., Marcé, R.M., Borrull, F., Pocurull, E., (2003). *J. Chromatogr. A*, **998**, 41.
- Buszewski, B., Studzinska, S., (2008). *Chromatographia*, **68**, 1.
- Buszewski, B., Szumski, M., Sus, S., (2002). *LC-GC Europe*, **15**, 792.
- Cabras, P., Angioni, A., Garau, V.L., Mellis, M., Pirisi, F.M., Minelli, E.V., Cabitzu, F., Cubeddu, M., (1997). *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 2708.
- Cabrera, K., (2004). *J. Sep. Sci.*, **27**, 843.
- Cai, L., Gong, S., Chen, M., Wu, C., (2006). *Anal. Chim. Acta*, **559**, 89.
- Cai, X., Zhang, D., Ju, H., Wu, G., Liu, X., (2004). *J. Chromatogr. B*, **802**, 239.
- Cai, Y., Jiang, G., Liu, J., Zhou, Q., (2003). *Anal. Chim. Acta*, **494**, 149.
- Cai, Y.Q., Cai, Y.E., Mou, S.F., Lu, Y.Q., (2005). *J. Chromatogr. A*, **1081**, 245.
- Cajka, T., Hajslová, J., (2004). *J. Chromatogr. A*, **1058**, 251.
- Cajka, T., Hajslová, J., Lacina, O., Mastovská, K., Lehotay, S.J., (2008). *J. Chromatogr. A*, **1186**, 281.
- Cámara, C., Fernández, P., Martín-Esteban, A., Pérez-Conde, C., Vidal, M., (2002). *Toma y tratamiento de muestras*. Ed. Síntesis. Madrid.
- Campoy, C., Jiménez, M., Olea-Serrano, M.F., Moreno-Frías, M., Cañabate, F., Olea, N., Bayés, R., Molina-Font, J.A., (2001). *Early Human Develop.*, **65**, S183.
- Cappiello, A., Famigliini, G., Palma, P., Mangani, F., (2002). *Anal. Chem.*, **74**, 3547.
- Cappiello, A., Famigliini, G., Mangani, F., Palma, P., Siviero, A., (2003). *Anal. Chim. Acta*, **493**, 125.
- Carabias-Martínez, R., Rodríguez-Gonzalo, E., Domínguez-Álvarez, J., Hernández-Méndez, J., (1999). *Anal. Chem.*, **71**, 2468.

- Carabias-Martínez, R., Rodríguez-Gonzalo, E., Domínguez-Álvarez, J., Pinto, C.G., Hernández-Méndez, J., (2003a). *J. Chromatogr. A*, **1005**, 23.
- Carabias-Martínez, R., Rodríguez-Gonzalo, E., Miranda-Cruz, E., Domínguez-Álvarez, J., Hernández-Méndez, J., (2007). *Electrophoresis*, **28**, 3606.
- Carabias-Martínez, R., Rodríguez-Gonzalo, E., Moreno-Cordero, B., Pérez-Pavón, J.L., García-Pinto, C., Fernández-Laespada, E., (2000). *J. Chromatogr. A*, **902**, 251.
- Carabias-Martínez, R., Rodríguez-Gonzalo, E., Revilla-Ruiz, P., Domínguez-Álvarez, J., (2003b). *J. Chromatogr. A*, **990**, 291.
- Carneiro, M.C., Puignou, L., Galcerán, M.T., (2000). *Anal. Chim. Acta*, **408**, 263.
- Carro, N., García, I., Ignacio, M., Mouteira, A., (2006). *Anal. Bioanal. Chem.*, **385**, 901.
- Cela, R., Lorenzo, R.A., Casais, M.C., (2002). *Técnicas de Separación en Química Analítica*. Ed. Síntesis, Madrid.
- Chan, R., Lok, K., Woo, J., (2009). *Molec. Nutr. Food Res.*, **53**, 201.
- Chang, S.Y., Wang, F.Y., (2004). *J. Chromatogr. B*, **799**, 265.
- Chaves, A., Shea, D., Danehower, D., (2008). *Chemosphere*, **71**, 629.
- Cheng, J., Liu, M., Yu, Y., Wang, X., Zhang, H., Ding, L., Jin, H., (2009). *Meat Sci.*, **82**, 407.
- Chen, G., Zhao, J., Tu, Y., He, P., Fang, Y., (2005). *Anal. Chim. Acta*, **533**, 11.
- Chen, H., Chen, H., Ying, J., Huang, J., Liao, L., (2009). *Anal. Chim. Acta*, **632**, 80.
- Chen, H., Ying, J., Chen, H., Huang, J., Liao, L., (2008a). *Chromatographia*, **68**, 629.
- Chen, J.B., Wei, L., Cui, Y.M., Zhao, D.Y., Yang, M.M. (2008b). *Chinese J. Anal. Chem.*, **36**, 401.
- Chen, L., Ding, L., Jin, H., Song, D., Zhang, H., Li, J., Zhang, K., Wang, Y., Zhang, H., (2007a). *Anal. Chim. Acta*, **589**, 239.
- Chen, X., Wang, Q.J., Zhang, S., Zhang, W.D., He, P.G., Fang, Y.Z., (2007b). *Talanta*, **71**, 1083.
- Cherkaoui, S., Veuthey, J.L., (2002). *Electrophoresis*, **23**, 442.

- Cho, S.K., El-Aty, A.M.A., Jeon, H.R., Choi, J.H., Shin, H.C., Shim, J.H., (2008). *Biomed. Chromatogr.*, **22**, 727.
- Chun, S. Dzyuba, S.V., Bartsh, R.A., (2001). *Anal. Chem.*, **73**, 3737.
- Chu, X.G., Hu, X.Z., Yao, H.Y., (2005). *J. Chromatogr. A*, **1063**, 201.
- Cortés-Aguado, S., Sánchez-Morito, N., (2007). *Anal. Lett.*, **40**, 2886.
- Cortés-Aguado, S., Sánchez-Morito, N., Arrebola, F.J., Garrido-Frenich, A., Martínez-Vidal, J.L., (2008). *Food Chem.*, **107**, 1314.
- Costa, L.G., Galli, C.L., Murphy, S.D., (1987). *Toxicology of pesticides: Experimental, clinical and regulatory perspectives*. Springer-Verlag. Berlín.
- Cunha, S.C., Fernandes, J.O., Alves, A., Oliveira, M.B.P.P., (2009). *J. Chromatogr. A*, **1216**, 119.
- Cunha, S.C., Fernandes, J.O., Oliveira, Beatriz, M., Oliveira, P.P. (2007a). *Talanta*, **73**, 514.
- Cunha, S.C., Lehotay, S.J., Mastovská, K., Fernandes, J.O., Oliveira, M.B.P.P., (2007b). *J. Sep. Sci.*, **30**, 620.
- Dai, L.M., Soundarrajan, P., Kim, T., (2002). *Pure Appl. Chem.*, **74**, 1735.
- Daneshfar, A., Khezeli, T., Lotfi, H.J. (2009). *J. Chromatogr. B*, **877**, 456.
- Dantas-Silva, M.G., Aquino, A., Silveira-Dórea, H., Navickiene, S., (2008). *Talanta*, **76**, 680.
- Dallüge, J., van Rijn, M., Beens, J., Vreuls, R.J.J., Brinkman, U.A.T., (2002). *J. Chromatogr. A*, **965**, 207.
- Da Silva, C.L., de Lima, E.C., Tavares, M.F.M., (2003). *J. Chromatogr. A*, **1014**, 109.
- Dean, J.R., Xiong, G., (2000). *Trends Anal. Chem.*, **19**, 553.
- Delgado, J.L., Herranz, M.A., Martín, N., (2007). *An. Quím.*, **103**, 5.
- Directiva 98/83/CE de 3 de Noviembre de 1998 del Parlamento Europeo y del Consejo sobre la calidad de las aguas destinadas al consumo humano. Bruselas. Diario Oficial de las Comunidades Europeas (DOCE) de 5 de diciembre de 1998, vol. 330.

- Djozan, Ebrahimi, B., (2008). *Anal. Chim. Acta*, **616**, 152.
- Domínguez-Boada, L., Lara, P.C., Álvarez-León, E.E., Losada, A., Zumbado, M.L., Limiñana-Cañal, J.M., Apolinario, R., Serra-Majem, L., Luzardo, O.P., (2007). *Growth Hormone & IGF Res.*, **17**, 506.
- Dömötöróvá, M., Hercegová, A., Matisová, E., (2006). *Czech. J. Food Sci.*, **24**, 84.
- Dömötöróvá, M., Matisová, E., (2008). *J. Chromatogr. A*, **1207**, 1.
- Dömötöróvá, M., Matisová, E., Hrouzková, S., Hercegová, A., (2005a). *Chem. Anal. (Warsaw)*, **50**, 365.
- Dömötöróvá, M., Matisová, E., Kirchner, M., de Zeeuw, J., (2005b). *Acta Chim. Slov.*, **52**, 422.
- Donato, P., Tranchida, P.Q., Dugo, P., Dugo, G., Mondello, L., (2007). *J. Sep. Sci.*, **30**, 508.
- Dorea-Haroldo, S., Lima-Sobrinho, L., (2004). *J. Braz. Chem. Soc.*, **15**, 690.
- Du, D., Wang, M., Zhang, J., Cai, J., Tu, H., Zhang, A., (2008). *Electrochem. Commun.*, **10**, 85.
- El-Bakouri, H., Ouassini, A., Aguado, J.M., García, J.U., (2007). *Water Environ. Res.*, **79**, 2578.
- El-Sheikh, A.H., Insisi, A.A., Sweileh, J.A. (2007). *J. Chromatogr. A*, **1164**, 25.
- El-Sheikh, A.H., Sweileh, J.A., Al-Degs, Y.S., Insisi, A.A., Al-Rabady, N., (2008). *Talanta*, **74**, 1675.
- Engindeniz, S., (2006). *Crop Protect.*, **25**, 534.
- Estadística Agraria de Canarias (2006). <http://www.gobiernodecanarias.org/agricultura/doc/otros/estadistica/resumen/r2006.pdf>. Mayo de 2009.
- Evdokimov, E., van Wandruszka, R., (1998). *Anal. Lett.*, **31**, 2289.
- Falqui-Cao, C., Wang, Z., Urruty, L., Pommier, J.J., Montury, M., (2001). *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 5092.
- Famigliani, G., Palma, P., Siviero, A., Rezai, M.A., Cappiello, A., (2005). *Anal. Chem.*, **77**, 7654.
- Fanali, S., D'Orazio, G., Rocco, A., (2006). *J. Sep. Sci.*, **29**, 1423.
- Fan, Y.C., Hu, Z.L., Chen, M.L., Tu, C.S., Zhu, Y., (2008). *Chinese Chem. Lett.*, **19**, 985.

- Farajzadeh, M.A., Hatami, M., (2004). *Chromatographia*, **59**, 259.
- Fariña, L., Boido, E., Carrau, F., Dellacassa, E., (2007). *J. Chromatogr. A*, **1157**, 46.
- Favari, L., López, E., Martínez-Tabche, L., Díaz Pardo, E., (2002). *Ecotoxicol. Environ. Safety*, **51**, 177.
- Fenoll, J., Hellín, P., López, J., González, A., Flores, P., (2007a). *Anal. Bioanal. Chem.*, **389**, 643.
- Fenoll, J., Hellín, P., Martínez, C.M., Miguel, M., Flores, P., (2007b). *Food Chem.*, **105**, 711.
- Fernández-Álvarez, M., Llopart, M., Lamas, J.P., Lores, M., García-Jares, C., Cela, R., Dagnac, T., (2008a). *J. Chromatogr. A*, **1188**, 154.
- Fernández-Álvarez, M., Llopart, M., Lamas, J.P., Lores, M., García-Jares, C., Cela, R., Dagnac, T., (2008b). *Anal. Chim. Acta*, **617**, 37.
- Fernández-Moreno, J.L., Arrebola-Liébanas, F.J., Garrido-Frenich, A., Martínez-Vidal, J.L., (2006). *J. Chromatogr. A*, **1111**, 97.
- Ferrer, A., (2003). *Annales Sis. San Navarra*, **26**, 155.
- Fidalgo-Used, N., Montes-Bayón, M., Blanco-González, E., Sanz-Medel, A., (2008). *Talanta*, **75**, 710.
- Fleeger, J.W., Carman, K.R., Nisbet, R.M., (2003). *Sci. Total Environ.*, **317**, 207.
- Fillion, J., Sauve, F., Selwyn, J., (2000). *J. AOAC Int.*, **83**, 698.
- Focant, J.F., Sjödin, A., Patterson, D.G., (2003). *J. Chromatogr. A*, **1019**, 143.
- Frías-García, S., Sánchez, M.J., Rodríguez-Delgado, M.A., (2004). *J. Sep. Sci.*, **27**, 660.
- Fries, G.F., (1995). *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, **141**, 71.
- Fu, L., Liu, X., Hu, J., Zhao, X., Wang, H., Wang, X., (2009). *Anal. Chim. Acta*, **632**, 289.
- Furlani, R.P.Z., Marcilio, K.M., Tfouni, A.V., (2008). *Toxicol. Lett.*, **180**, S75.
- Furusawa, N., (2004). *Anal. Bioanal. Chem.*, **378**, 2004.

Bibliografía

- Furusawa, N., (2005). *Chromatographia*, **62**, 315.
- Fytianos, K., Raikos, N., Theodoridis, G., Velinova, Z., Tsoukali, H., (2006). *Chemosphere*, **65**, 2090.
- Gámiz-Gracia, L., García-Campaña, A., Soto-Chinchilla, J.J., Huertas-Pérez, J.F., González-Casado, A., (2005). *Trends Anal. Chem.*, **24**, 927.
- Gamón, M., Ten, A., Lleó, C., Mocholí, F., (2001). *J. AOAC Int.*, **84**, 1209.
- García de Llasera, M.P., Gómez-Almaraz, L., Vera-Ávila, L.E., Peña, Álvarez, A., (2005). *J. Chromatogr. A*, **1093**, 139.
- García-López, M., Canosa, P., Rodríguez, I., (2008). *Anal. Bioanal. Chem.*, **391**, 963.
- García-López, M., Rodríguez, I., Cela, R., (2007). *J. Chromatogr. A.*, **1166**, 9.
- García, M.A., Oliva, J., Barba, A., Cámara, M.A., Pardo, F., Díaz-Plaza, E.M., (2004). *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 1241.
- García-Ruiz, C., Marina, M.L., (2005). *CTA*, **26**, 55.
- Garrido-Frenich, A., Martínez-Vidal, J.L., Pastor-Montoro, E., Romero-González, R., (2008). *Anal. Bioanal. Chem.*, **390**, 947.
- Garrido-Frenich, A., Plaza-Bolaños, P., Martínez-Vidal, J.L., (2007). *J. Chromatogr. A.*, **1153**, 194.
- Gavrilescu, M., (2005). *Eng. Life Sci.*, **5**, 497.
- Geerdink, R.B., Niessen, W.M.A., Brinkman, U.A.T., (2002). *J. Chromatogr. A.*, **970**, 65.
- Gervais, G., Brosillon, S., Laplanche, A., Helen, C., (2008). *J. Chromatogr. A.*, **1202**, 163.
- Gharehbaghi, M., Shemirani, F., Baghdadi, M., (2009). *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, **89**, 21.
- Giordano, A., Fernández-Franzón, M., Ruiz, M.J., Font, G., Picó, Y., (2009). *Anal. Bioanal. Chem.*, **393**, 1733.
- Gonçalves, C., Alpendurada, M.F., (2002). *J. Chromatogr. A.*, **963**, 19.
- Gonçalves, C., Alpendurada, M.F., (2004). *J. Chromatogr. A.*, **1026**, 239.

- Gorecki, T., Xu, X.M., Pawliszyn, J., (1999). *Analyst*, **124**, 64.
- Goto, T., Ito, Y., Oka, H., Saito, I., Matsumoto, H., Sugiyama, H., Ohkubo, C., Nakazawa, H., Nagase, H., (2005). *Anal. Chim. Acta*, **531**, 79.
- Grimalt, S., Pozo, O.J., Sancho, J.V., Hernández, F., (2007). *Anal. Chem.*, **79**, 2833.
- Gualberto, R., Rabelo de Oliveira, P.S., Vilela-Resende, F., (2002). *Sci. Agric.*, **59**, 803.
- Guan, W., Wang, Y.J., Xu, F., Guan, Y.F., (2008). *J. Chromatogr. A*, **1177**, 28.
- Hada, M., Takino, M., Yamagami, T., Daishima, S., Yamaguchi, K., (2000). *J. Chromatogr. A*, **874**, 81.
- Hanley, M.E., Whiting, M.D., (2005). *Ecotoxicol.*, **14**, 483.
- Hantash, J., Bartlett, A., Oldfield, P., Dénès, G., O'Rielly, R., Roudiere, D., Menduni, S., (2006). *J. Chromatogr. A*, **1125**, 104.
- Hela, D.G., Konstantinou, I.K., Sakellarides, T.M., Lambropoulou, D.A., Akriotis, T., Albanis, T.A., (2006). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **50**, 603.
- Hercegová, A., Dömötöróvá, M., Hrouzková, S., Matisová, E., (2007). *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, **87**, 957.
- Hercegová, A., Dömötöróvá, M., Kruzlicová, D., Matisová, E., (2006). *J. Sep. Sci.*, **29**, 1102.
- Hercegová, A., Dömötöróvá, M., Matisová, E., Kirchner, M., Otrekal, R., Stefuca, V., (2005). *J. Chromatogr. A*, **1084**, 46.
- Hernández-Borges, J., Aturki, Z., Rocco, A., Fanali, A., (2007). *J. Sep. Sci.*, **30**, 1589.
- Hernández-Borges, J., Cabrera-Cabrera, J., Rodríguez-Delgado, M.A., Hernández-Suárez, E.M., Galán-Saúco, V., (2009). *Food Chem.*, **113**, 313.
- Hernández-Borges, J., Cifuentes, A., García-Montelongo, F.J., Rodríguez-Delgado, M.A., (2005a). *Electrophoresis*, **26**, 980.
- Hernández-Borges, J., Frías-García, S., Cifuentes, A., Rodríguez-Delgado, M.A., (2004a). *J. Sep. Sci.*, **27**, 947.

Bibliografía

- Hernández-Borges, J., García-Montelongo, F.J., Cifuentes, A., Rodríguez-Delgado, M.A., (2005b). *J. Chromatogr. A*, **1070**, 171.
- Hernández-Borges, J., García-Montelongo, F.J., Cifuentes, A., Rodríguez-Delgado, M.A., (2005c). *J. Chromatogr. A*, **1100**, 236.
- Hernández-Borges, J., Rodríguez-Delgado, M.A., García-Montelongo, F.J., Cifuentes, A., (2004b). *Electrophoresis*, **25**, 2065.
- Hernández-Borges, J., Rodríguez-Delgado, M.A., García-Montelongo, F.J., Cifuentes, A., (2005d). *J. Sep. Sci.*, **28**, 948.
- Hernández, F., Pozo, O.J., Sancho, J.V., Bijlsma, L., Barreda, M., Pitarch, E., (2006). *J. Chromatogr. A*, **1109**, 242.
- He, Y., Liu, Y.H., (2007). *Chromatographia*, **65**, 581.
- Hinsmann, P., Arce, L., Ríos, A., Valcárcel, M., (2000). *J. Chromatogr. A*, **866**, 137.
- Hird, S., (2008). *Analysis of pesticides by chromatographic techniques coupled with mass spectrometry*. En: Tadeo, J.L. (ed.). *Analysis of pesticides in food and environmental samples*. Taylor & Francis Group. Florida.
- Hogendoorn, E., van Zoonen, P., (2000). *J. Chromatogr. A*, **892**, 435.
- Horstkotter, C., Kober, S., Spahn-Langguth, H., Mutschler, E., Blaschke, G., (2002). *J. Chromatogr. B*, **769**, 107.
- http://ec.europa.eu/food/plant/protection/index_es.htm. Mayo de 2009.
- http://ec.europa.eu/food/plant/protection/pesticides/index_en.htm. Mayo de 2009.
- http://ec.europa.eu/food/plant/protection/resources/qualcontrol_en.pdf. Mayo de 2009.
- http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm?event=substance.selection&ch=1. Mayo de 2009.
- <http://europa.eu/scadplus/leg/es/lvb/l21288.htm>. Mayo de 2009.
- <http://europa.eu/scadplus/leg/es/lvb/l28002b.htm>. Mayo de 2009.

- <http://www.aepla.es>
- <http://www.boe.es/boe/dias/2003/03/08/pdfs/A09299-09308.pdf>
- <http://www.codexalimentarius.net>
- <http://www.epa.gov>
- <http://www.epa.gov/pesticides/about/types.htm>. Mayo de 2009.
- <http://www.fao.org>
- <http://www.mapa.es/es/agricultura/pags/fitos/registro/menu.asp>. Mayo de 2009.
- http://www.mma.es/portal/secciones/calidad_contaminacion/indicadores_ambientales/banco_publico_ia/. Mayo de 2009.
- http://www.mma.es/portal/secciones/calidad_contaminacion/indicadores_ambientales/banco_publico_ia/pdf/AGRConsumoFitosanitarios.pdf. Mayo de 2009.
- http://www.mma.es/portal/secciones/calidad_contaminacion/indicadores_ambientales/banco_publico_ia/pdf/AGREcologica.pdf. Mayo de 2009.
- Huang, L., Lin, J.M., Xu, L.J., Chen, G.N., (2007). *Electrophoresis*, **28**, 2758.
- Huang, S.P., Huang, S.D., (2006). *J. Chromatogr. A*, **1135**, 6.
- Huddleston, J.G., Visser, A.E., Reichert, W.M., Willauer, H.D., Broker, G.A., Rogers, R.D., (2001). *Green Chem.*, **3**, 156.
- Huertas-Pérez, J.F., del Olmo-Iruela, M., García-Campaña, A.M., González-Castro, A., Sánchez-Navarro, A., (2006). *J. Chromatogr. A*, **1102**, 280.
- Huertas-Pérez, J.F., García-Campaña, A.M., (2008). *Anal. Chim. Acta*, **630**, 194.
- Hu, J., Fu, L., Zhao, X., Liu, X., Wang, H., Wang, X., Dai, L., (2009). *Anal. Chim. Acta*, **640**, 100.
- Húsková, R., Matisová, E., Kirchner, M., (2008). *Chromatographia*, **68**, S48.
- Hu, X., Jianxin, Y., Zhigang, Y., Lansun, N., Yanfei, L., Peng, W., Jing, L., Xin, H., Xiaogang, C., Yibin, Z., (2004). *J. AOAC Int.*, **87**, 972.

- Hu, Y.X., Yang, X.M., Wang, C., Zhao, J., Li, W.N., Wang, Z., (2008). *Food Add. Contam.*, **25**, 314.
- Iijima, S., (1991). *Nature*, **354**, 56.
- Iijima, S., Ichihashi, T., (1993). *Nature*, **363**, 603.
- Informe Eurostat (2007). *Energy, transport and environment indicators*. Comisión Europea. Luxemburgo. http://epp.eurostat.ec.europa.eu/portal/page?_pageid=1073,46587259&_dad=portal&_schema=PORTAL&p_product_code=KS-DK-07-001
- Ingelse, B.A., van Dam., R.C.J., Vreeken, R.J., Mol., H.G.J., Steijger, O.M., (2001). *J. Chromatogr. A*, **918**, 67.
- Instituto Canario de Estadística del Gobierno de Canarias. http://www.gobiernodecanarias.org/istac/estadisticas/php/saltarA.php?mid=/istac/estadisticas/sector_primario/area_09_frame.html
- Ishizuka, N., Kobayashi, H., Minakuchi, H., Nakanishi, K., Hirao, K., Hosoya, K., Ikegami, T., Takana, N., (2002). *J. Chromatogr. A*, **960**, 85.
- Jeyaratman, J., Maroni, M., (1994). *Toxicol.*, **91**, 15.
- Jia, G.G., Lv, C.G., Zhu, W.T., Qiu, J., Wang, X.Q., Zhou, Z.Q., (2008). *J. Hazardous Materials*, **159**, 300.
- Ji, J., Deng, C.H., Zhang, H.Q., Wu, Y.Y., Zhang, X.M., (2007). *Talanta*, **71**, 1068.
- Jiménez, J.J., Bernal, J.L., del Nozal, M.J., Bernal, J., Toribio, L., (2007). *Food Chem.*, **104**, 216.
- Jiménez, J.J., Bernal, J.L., del Nozal, M.J., Toribio, L., Arias, E., (2001). *J. Chromatogr. A*, **919**, 147.
- Juan-García, A., Font, G., Picó, Y., (2005a). *Electrophoresis*, **26**, 1550.
- Juan-García, A., Font, G., Picó, Y., (2007). *J. Chromatogr. A*, **1153**, 104.
- Juan-García, A., Mañes, J., Font, G., Picó, Y., (2004). *J. Chromatogr. A*, **1050**, 119.
- Juan-García, A., Picó, Y., Font, G., (2005b). *J. Chromatogr. A*, **1073**, 229.
- Karcher, A., El Rassi, Z., (1999). *Electrophoresis*, **20**, 3280.
- Kataoka, H., Lord, H.L., Pawliszyn, J., (2000). *J. Chromatogr. A*, **880**, 35.

- Katsumata, H., Matsumoto, T., Kaneco S., Suzuki, T., Ohta, K., (2008). *Microchem. J.*, **88**, 82.
- Kende, A., Csizmazia, Z., Rikker, T., Angyal, V., Torkos, K., (2006). *Microchem. J.*, **84**, 63.
- Kerkdijk, H., Mol, H.G.J., van der Nagel, B., (2007). *Anal. Chem.*, **79**, 7975.
- Kester, J.E., (2001). *Endocrine-Disrupting Chemicals*. En: Sullivan, J.B., Krieger, G.R. (eds.). *Clinical Environmental Health and Toxic Exposures*. Lippincott Williams y Wilkins. Filadelfia.
- Khaledi, M.G., (1998). *High Performance Capillary Electrophoresis*, Wiley. Nueva York.
- Khrolenko, M., Dzygiel, P., Wieczorek, P., (2002). *J. Chromatogr. A*, **975**, 219.
- Khrolenko, M.V., Wieczorek, P.P., (2005). *J. Chromatogr. A*, **1093**, 111.
- Khummueng, W., Trenerry, C., Rose, G., Marriott, P.J., (2006). *J. Chromatogr. A*, **1131**, 203.
- Kim, B., Lee, Y.H., Ryu, J.H., Suh, K.D., (2006). *Colloids Surf. A*, **273**, 161.
- Kirchner, M., Húsková, R., Matisová, E., Mocak, J., (2008). *J. Chromatogr. A*, **1186**, 271.
- Kirchner, M., Matisová, E., Otrekal, R., Hercegová, A., de Zeeuw, J., (2005). *J. Chromatogr. A*, **1084**, 63.
- Klein, C., Schneider, R.J., Meyer, M.T., Aga, D.S., (2006). *Chemosphere*, **62**, 1591.
- Klein, J., Alder, L., (2003). *J. AOAC Int.*, **86**, 1015.
- Koal, T., Asperger, A., Efer, J., Engewald, W., (2003). *Chromatographia*, **57**, S93.
- Kochman, M., Gordin, A., Alon, T., Amirav, A., (2006). *J. Chromatogr. A*, **1129**, 95.
- Kochman, M., Gordin, A., Goldschlag, P., Lehotay, S.J., Amirav, A., (2002). *J. Chromatogr. A*, **974**, 185.
- Kodama, S., Saito, Y., Chinaka, S., Yamamoto, A., Hayakawa, K., (2006). *J. Health Sci.*, **52**, 489.
- Koesukwiwat, U., Sanguankaew, K., Leepipatpiboon, N., (2008). *Anal. Chim. Acta*, **626**, 10.
- Korenková, E., Matisová, E., Slobodník, J., (2003). *J. Sep. Sci.*, **26**, 1193.

- Korytár, P., Janssen, E., Matisová, E., Brinkman, U.A.T., (2002). *Trends Anal. Chem.*, **21**, 558.
- Kovalczuk, T., Jech, M., Poustka, J., Hajslová, J., (2006). *Anal. Chim. Acta*, **577**, 8.
- Krinsky, N.I., Johnson, E.J., (2005). *Mol. Aspects Med.*, **26**, 459.
- Kruve, A., Künnapas, A., Herodes, K., Leito, I., (2008). *J. Chromatogr. A*, **1187**, 58.
- Kumar, A., Gaurav, Malik, A.K., Tewary, D.K., Singh, B., (2008). *Anal. Chim. Acta*, **610**, 1.
- Lambropoulou, D.A., Albanis, T.A., (2007a). *Anal. Bioanal. Chem.*, **389**, 1663.
- Lambropoulou, D.A., Albanis, T.A., (2004). *Anal. Chim. Acta.*, **514**, 125.
- Lambropoulou, D.A., Albanis, T.A., (2002). *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 3359.
- Lambropoulou, D.A., Albanis, T.A., (2007b). *J. Biochem. Biophys. Methods*, **70**, 195.
- Lambropoulou, D.A., Albanis, T.A., (2003). *J. Chromatogr. A*, **993**, 197.
- Lambropoulou, D., Sakellarides, T., Albanis, T., (2000). *Fres. J. Anal. Chem.*, **368**, 616.
- Lancas, F.M., Queiroz, M.E.C., Grossi, P., Olivares, I.R.B., (2009). *J. Sep. Sci.*, **32**, 813.
- Leandro, C.C., Hancock, P., Fussell, R.J., Keely, B.J., (2007). *J. Chromatogr. A*, **1144**, 161.
- Lehotay, S.J., (2000). *J. AOAC Int.*, **83**, 680.
- Lehotay, S.J., (2007). *J. AOAC Int.*, **90**, 485.
- Lehotay, S.J., Loghtfield, A.R., Harman-Fetcho, J.A., Donoghue, D.A., (2001). *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 4589.
- Lesueur, C., Gartner, M., Mentler, A., Fuerhacker, M., (2008a). *Talanta*, **75**, 284.
- Lesueur, C., Knittl, P., Gartner, M., Mentler, A., Fuerhacker, M., (2008b). *Food Control*, **19**, 906.
- Liang, P., Guo, L., Liu, Y., Liu, S., Zhang, T.Z., (2005). *Microchem. J.*, **80**, 19.
- Liang, P., Liu, Y., Guo, L., Zeng, J., Lu, H., (2004). *J. Anal. At. Spectrom.*, **19**, 1489.

- Liang, P., Sang, H.B., (2008). *Anal. Biochem.*, **380**, 21.
- Li, J., Koehne, J.E., Cassel, A.M., Chen, H., Ng, H.T., Ye, Q., Fan, W., Han, J., Meyyappan, M., (2005). *Electroanal.*, **17**, 15.
- Liu, F., Bischoff, G., Pestemer, W., Xu, W., Kofoet, A., (2006). *Chromatographia*, **63**, 233.
- Liu, J.F., Li, N., Jiang, G.B., Liu, J.M., Jönsson, J.A., Wen, M.J., (2005a). *J. Chromatogr. A*, **1066**, 27.
- Liu, J.F., Li, N., Jiang, G.B., Chi, Y.G., Cai, Y.Q., Zhou, Q.X., Hu, J.T., (2003). *Anal. Chem.*, **75**, 5870.
- Liu, T.T., Yang, T.S., (2002). *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 653.
- Liu, W.M., Hu, Y., Zhao, J.H., Xu, Y., Guan, Y.F., (2005b). *J. Chromatogr. A*, **1095**, 1.
- Liu, Y., Zhao, E., Zhu, W., Gao, H., Zhou, Z., (2009). *J. Chromatogr. A*, **1216**, 885.
- Li, X., Zhang, Q., Dai, J., Gan, Y., Zhou, J., Yang, X., Cao, H., Jiang, G., Xu, M., (2008). *Chemosphere*, **72**, 1145.
- Longnecker, M.P., Rogan, W.J., Lucier, G., (1997). *Ann. Rev. Public*, **18**, 211.
- Long, R.Q., Yang, R.T., (2001). *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 2058.
- López-Feria, S., Cárdenas, S., Valcárcel, M., (2009). *J. Chromatogr. A*, en prensa. doi:10.1016/j.chroma.2009.02.060.
- López, R., Goñi, F., Etxandia, A., Millán, E., (2007). *J. Chromatogr. B*, **846**, 298.
- Lü, J., Liu, J., Wei, Y., Jiang, K., Fan, S., Liu, J., Jiang, G., (2007). *J. Sep. Sci.*, **30**, 2138.
- Luzardo, O.P., Goethals, M., Zumbado, M., Álvarez-León, E.E., Cabrera, F., Serra-Majem, L., Domínguez-Boada, L., (2006). *Sci. Total Environ.*, **367**, 129.
- Maggi, L., Carmona, M., del Campo, C.P., Zalacaín, A., de Mendoza, J.H., Mocholí, F.A., Alonso, G.L., (2008). *J. Chromatogr. A*, **1209**, 55.
- Mahugo-Santana, C., Sosa-Ferrera, Z., Santana-Rodríguez, J.J., (2005). *Anal. Bioanal. Chem.*, **382**, 125.

Bibliografía

- Martínez-Vidal, J.L., Fernández-Moreno, J.L., Arrebola-Liébanas, F.J., Garrido-Frenich, A., (2007). *J. AOAC Int.*, **90**, 1146.
- Mastovská, K., Lehotay, S.J., Hajslová, J., (2001). *J. Chromatogr. A*, **926**, 291.
- Matisová, E., Dömötöróvá, M., (2003). *J. Chromatogr. A*, **1000**, 199.
- Mateo, R., Carrillo, J., Guitart, R., (2000). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **65**, 780.
- Melwanki, M.B., Chen, W.S., Bai, H.Y., Lin, T.Y., Fuh, M.R., (2009). *Talanta*, **78**, 618.
- Menzinger, F., Schmitt-Kopplin, P., Freitag, D., Kettrup, A., (2000). *J. Chromatogr. A*, **891**, 45.
- Mezcua, M., Agüera, A., Lliberia, J.L., Cortés, M.A., Bagó, B., Fernández-Alba, A.R., (2006). *J. Chromatogr. A*, **1109**, 222.
- Michel, M., Gnusowski, B., Buszewski, B., (2006). *J. Liquid Chromatogr. Rel. Technol.*, **29**, 247.
- Miller, J.N., Miller, J.C., (2002). *Statistics and Chemometrics for Chemical Analysis*. Prentice Hall, Madrid.
- Mineau, P., (2005). *Ecotoxicol.*, **14**, 775.
- Min, G., Wang, S., Zhu, H., Fang, G., Zhang, Y. (2008). *Sci. total Environ.*, **396**, 79.
- Moinfar, S., Milani-Hosseini, M.R., (2009). *J. Hazardous Materials*, en prensa. doi:10.1016/j.jhazmat.2009.04.030.
- Molina-Mayo, C., Hernández-Borges, J., Borges-Miquel, T.M., Rodríguez-Delgado, M.A., (2007). *J. Chromatogr. A*, **1150**, 348.
- Monagas, P., Orós, J., Araña, J., González-Díaz, O.M., (2008). *Marine Pollut. Bull.*, **56**, 1949.
- Moneti, G., Pieraccini, G., Bartolucci, G., Guida, G., Seraglia, R., Traldi, P., (2001). *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **15**, 1609.
- Monteiro, dos Reis-Coimbra, J.S., Minim, L.A., Alves de Oliveira, J., Mendes da Silva, L.H., (2008). *J. Chromatogr. B*, **867**, 189.

- Moreno-Cordero, B., Pérez-Pavón, J.L., García-Pinto, C., (1998). *Organophosphorus pesticides: cloud point preconcentration*. En: Meyers, R.A. (ed.). *Encyclopedia of environmental analysis and remediation*, ed., Wiley & Sons, Inc. Nueva York.
- Moreno-Frías, M., Garrido-Frenich, A., Martínez-Vidal, J.L., Mateu-Sánchez, M., Olea, F., Olea, N., (2001). *J. Chromatogr. B*, **760**, 1.
- Moreno, M., Bermejo, E., Sánchez, A., Chicharro, M., Zapardiel, A., (2008). *Anal. Bioanal. Chem.*, **391**, 867.
- Moroi, Y., (1992). *Micelles-Theoretical and applied aspects*. Plenum Press. Nueva York.
- Mullett, W.M., Pawliszyn, J., (2003). *J. Sep. Sci.*, **26**, 251.
- Muñoz-Carpena, R., Cabrera, M.C., Socorro, A.R., González, G., Poncela, R., Hernández-Moreno, J.M., Beltrán, J., (1998). *Contaminación por plaguicidas en acuíferos y suelos en las Islas Canarias. Comparación de métodos de muestreo*. En: Morell, I., Candela, L. (eds.). *Plaguicidas. Aspectos ambientales, analíticos y toxicológicos*. Castellón de la Plana.
- Navalón, A., Prieto, A., Araujo, L., Vilchez, J.L., (2002). *J. Chromatogr. A*, **975**, 355.
- Navarro, S., Barba, A., Oliva, J., Navarro, G., Pardo, F., (1999). *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 264.
- Nguyen, A.L., Luong, J.H.T., (1997). *Anal. Chem.*, **69**, 1726.
- Nguyen, T.D., Yu, J.E., Lee, D.M., Lee, G.H., (2008). *Food Chem.*, **110**, 207.
- Niu, H., Shi, Y., Cai, Y., Wei, F., Jiang, G., (2009). *Microchim. Acta*, **164**, 431.
- Nogueira, J.M.F., Sandra, T., Sandra, P., (2003). *J. Chromatogr. A*, **996**, 133.
- Nogueira, J.M.F., Sandra, T., Sandra, P., (2004). *Anal. Chim. Acta*, **505**, 209.
- Nozal, M.J., Bernal, J.L., Jiménez, J.J., Martín, M.T., Bernal, J., (2005). *J. Chromatogr. A*, **1076**, 90.
- Núñez, O., Sentellas, S., (2002). *CTA*, **23**, 28.
- Ochiai, N., Sasamoto, K., Kanda, H., Nakamura, S., (2006). *J. Chromatogr. A*, **1130**, 83.
- Ochiai, N., Sasamoto, K., Kanda, H., Pfannkoch, E., (2008). *J. Chromatogr. A*, **1200**, 72.

- Oliva, J., García, M.A., Navarro, S., Pardo, F., Barba, A., (2001). *Enólogos*, **9**, 18.
- OMS, 2004. http://www.who.int/ipcs/publications/pesticides_hazard/en/. Mayo de 2009.
- *Ordonnance du DFI du 26 juin 1995 sur les substances étrangères et les composants dans les denrées alimentaires* (OSEC, RS 817.021.23), cuya última modificación es la OSEC de 26 de noviembre de 2008.
- Orozco, C., Pérez, A., González, M.N., Rodríguez, F.J., Alfayate, J.M., (2003). *Contaminación Ambiental. Una visión desde la Química*. Thomson. España.
- Otteneder, H., Majerus, P., (2005). *Bull. l'O.I.V.*, **78**, 173.
- Padrón-Sanz, C., Halko, R., Sosa-Ferrera, Z., Santana-Rodríguez, J.J., (2004). *Anal. Chim. Acta*, **524**, 265.
- Pang, G.F., Fan, C.L., Liu, Y.M., Cao, Y.Z., Zhang, J.J., Fu, B.L., Li, X.M., Li, Z.Y., Wu, Y.P., (2006a). *Food Add. Contam.*, **23**, 777.
- Pang, G.F., Fan, C.L., Liu, Y.M., Cao, Y.Z., Zhang, J.J., Li, X.M., Li, Z.Y., Wu, Y.P., Guo, T.T., (2006b). *J. AOAC Int.*, **89**, 740.
- Parrilla-Vázquez, P., Mughari, A.R., Martínez-Galera, M., (2008). *Anal. Chim. Acta*, **607**, 74.
- Patel, K., Fussell, R.J., Goodall, D.M., Keely, B.J., (2003). *Analyst*, **128**, 1228.
- Patil, J.A., Patil, A.J., Govindwar, S.P., (2003). *Indian J. Clinical. Biochem.*, **18**, 16.
- Pawliszyn, J., (1997). *Solid phase microextraction, theory and practice*. Wiley-VCH. Nueva York.
- Pawlowski, T.M., Poole, C.F., (1998). *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 3124.
- Payá, P., Anastassiades, M., Mack, D., Sigalova, I., Tasdelen, B., Oliva, J., Barba, A., (2007). *Anal. Bioanal. Chem.*, **389**, 1697.
- Pérez-Carrera, E., León-León, V.M., Gómez-Parra, A., González-Mazo, E., (2007). *J. Chromatogr. A*, **1170**, 82.
- Pérez-Ruiz, T., Martínez-Lozano, C., Sanz, A., Bravo, E., (2005). *Chromatographia*, **61**, 493.
- Pichon, V., Chapuis-Hugon, F., (2008). *Anal. Chim. Acta*, **622**, 48.

- Picó, Y., Kozmutza, C., (2007). *Anal. Bioanal. Chem.*, **389**, 1805.
- Picó, Y., La Farré, M., Soler, C., Barceló, D., (2007). *J. Chromatogr. A*, **1176**, 123.
- Picó, Y., Rodríguez, R., Mañes, J., (2003). *Trends Anal. Chem.*, **22**, 133.
- Planas, C., Puig, A., Rivera, J., Caixach, J., (2006). *J. Chromatogr. A*, **1131**, 242.
- Plenge-Tellechea, F., Sierra-Fonseca, J.A., Castillo-Sosa, Y.A., (2007). *Tecnociencia*, **1**, 4.
- Pokorná, L., Pacheco, M.L., Havel, J. (2000). *J. Chromatogr. A*, **895**, 345.
- Poole, C.F., (2007). *J. Chromatogr. A*, **1158**, 241.
- Pozo, O.J., Barreda, M., Sancho, J.V., Hernández, F., Lliberia, J.L., Cortés, M.A., Bagó, B., (2007). *Anal. Bioanal. Chem.*, **389**, 1765.
- Prince, A.E., Fan, T.S., Skoczinski, B.A., Bushway, R.J., (2001). *Anal. Chim. Acta*, **444**, 37.
- Proyecto AQUAMAC II (2007). *Seguimiento del estado de las aguas subterráneas en Tenerife*. Proyecto Interreg III-B en el que participan el Consejo Insular de Aguas, el Instituto Tecnológico de Canarias, el Gobierno de Canarias, Secretaría Regional do Ambiente e do Mar (Azores), *Investimentos e Gestão da Água, S.A. (Madeira)*, *Universidade de Madeira*, *Consejo Insular de Aguas de Gran Canarias*, *Mancomunidad del Sureste de Gran Canaria*, *Cabildo de Lanzarote e Icodemsa*. http://aquamac.itccanarias.org/index.php?option=com_docman&task=cat_view&gid=54&Itemid=75.
- Quirino, J.P., Terabe, S., (2000). *J. Chromatogr. A*, **902**, 119.
- Radisic, M., Grujic, S., Vasiljevic, T., Lausevic, M., (2009). *Food Chem.*, **113**, 712.
- Ramírez, J.A., Lacasaña, M., (2001). *Arch. Prev. Riesgos Labor.*, **4**, 67.
- Raposo-Júnior, J.L., Ré-Poppi, N., (2007). *Talanta*, **72**, 1833.
- RD 290/2003 de 7 de marzo (BOE nº 58 de 8 de marzo de 2003) por el que se establecen los métodos de muestreo para el control de residuos de plaguicidas en productos de origen vegetal y animal.

- Reglamento CE nº 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo de 23 de febrero de 2005 relativo a los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal y que modifica la Directiva 91/414/CEE del Consejo.
- Rezaee, M., Yamini, Y., Shariati, S., Esrafil, A., Shamsipur, M., (2009). *J. Chromatogr. A*, **1216**, 1511.
- Rial-Otero, R., Yagüe-Ruiz, C., Cancho-Grande, B., Simal-Gándara, J., (2002). *J. Chromatogr. A*, **942**, 41.
- Ribes, A., Grimalt, J.O., Torres-García, C.J., Cuevas, E., (2002). *Environ. Sci. Technol.*, **36**, 1879.
- Risticvic, S., Niri, V.H., Vuckovic, D., Pawliszyn, J., (2009). *Anal. Bioanal. Chem.*, **393**, 781.
- Rodil, R., Popp, P., (2006). *J. Chromatogr. A*, **1124**, 82.
- Rodríguez, R., Mañes, J., Picó, Y., (2003). *Anal. Chem.*, **75**, 452.
- Rodríguez, R., Picó, Y., Font, G., Mañes, J., (2002). *J. Chromatogr. A*, **949**, 359.
- Romero-González, R., Garrido-Frenich, A., Martínez-Vidal, J.L., (2008). *Talanta*, **76**, 211.
- Romero-González, R., Pastor-Montoro, E., Martínez-Vidal, J.L., Garrido-Frenich, A., (2006). *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **20**, 2701.
- Roper, M.G., Guillo, C., Venton, B.J., (2008). *High speed electrophoretic separations*. En: Landers, J.P. (ed.). *Capillary and microchip electrophoresis and associated microtechniques*. Taylor & Francis Group. Florida.
- Rosales-Conrado, N., León-González, M.E., D'Orazio, G., Fanali, S., (2004). *J. Sep. Sci.*, **27**, 1303.
- Ross, G.A., (2001). *LC-GC Europe*, **1**, 2.
- Safarpour, H., Asiaie, R., Katz, S., (2004). *J. Chromatogr. A*, **1036**, 217.
- Salafranca, J., Domeño, C., Fernández, C., Nerón, C., (2003). *Anal. Chim. Acta*, **477**, 257.
- Sánchez-Brunete, C., Miguel, E., Tadeo, J.L., (2008). *Talanta*, **74**, 1211.
- Sánchez-Hernández, J.C., Carbonell, R., Henríquez-Pérez, A., Montealegre, M., Gómez, L., (2004). *Environ. Pollut.*, **132**, 479.

- Sánchez-Ortega, A., Sampedro, M.C., Unceta, N., Goicolea, M.A., Barrio, R.J., (2005). *J. Chromatogr. A*, **1094**, 70.
- Sasano, R., Hamada, T., Kurano, M., Furuno, M., (2000). *J. Chromatogr. A*, **896**, 41.
- Schellin, M., Hauser, B., Popp, P., (2004). *J. Chromatogr. A*, **1040**, 251.
- Schreck, E., Geret, F., Gontier, L., Treilhou, M., (2008). *Talanta*, **77**, 298.
- Segura-Carretero, A.S., Cruces-Blanco, C., Ramírez, S.C., Pancorbo, A.C., Gutiérrez, A.F., (2004). *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 5791.
- Sereshti, H., Karimi, M., Samadi, S., (2009). *J. Chromatogr. A*, **1216**, 198.
- Shadpour, H., Musyimi, H., Chen, J., Soper, S.A., (2006). *J. Chromatogr. A*, **1111**, 238.
- Shamsi, S.A., Danielson, N.D., (2007). *J. Sep. Sci.*, **30**, 1729.
- Shen, H., Main, K.M., Virtanen, H.E., Damgaard, I.N., Haavisto, A.M., Kaleva, M., Boisen, K.A., Schmidt, I.M., Chellakooty, M., Skakkebaek, N.E., Toppari, J., Schramm, K.W., (2007). *Chemosphere*, **67**, S256.
- Shen, X., Jibao, C., Yun, G., Qingde, S., (2006). *Chromatographia*, **64**, 71.
- Shen, Z., Cai, J., Gao, Y., Zhu, X., Su, Q., (2005). *Fenxi Huaxue*, **33**, 1318.
- Simplício, A.L., Vilas-Boas, L., (1999). *J. Chromatogr. A*, **833**, 35.
- Simpson, S.L., Quirino, J.P., Terabe, S., (2008). *J. Chromatogr. A*, **1184**, 504.
- Singh, S.B., Foster, G.D., Khan, S.U., (2007). *J. Chromatogr. A*, **1148**, 152.
- Skrbic´, B. y Durisic´-Mladenovic´, N., (2007). *Chemosphere*, **68**, 2144.
- Soboleva, E., Ahad, K., Ambrus, A., (2004). *Analyst*, **129**, 1123.
- Soler, C., Mañes, J., Picó, Y., (2005). *J. Chromatogr. A*, **1088**, 224.
- Soriano-Lopes, A., Simone-García, J., Ramos-Catharino, R., Silva-Santos, L., Nogueira-Eberlin, M., Zezzi-Arruda, A., (2007). *Anal. Chim. Acta*, **590**, 166.

Bibliografía

- Sun, Z., Liang, P., Ding, Q., Cao, J., (2006). *Anal. Sci.*, **22**, 911.
- Swartz, M., Murphy, B., (2004). *LabPlus Int.*, **18**, 6.
- Tadeo, J.L., Sánchez-Brunete, C., Albero, B., González, L., (2004). *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **34**, 121.
- Takino, M., Daishima, S., Nakahara, T., (2001). *Analyst*, **126**, 602.
- Tamayo, F.G., Martín-Esteban, A., (2005). *J. Chromatogr. A*, **1098**, 116.
- Tanaka, N., Kobayashi, H., Ishizuka, N., Minakuchi, H., Nakanishi, K., Hosoya, K., Ikegami, T., (2002). *J. Chromatogr. A*, **965**, 35.
- Taylor, J.A., Yeung, E.S., (1991). *J. Chromatogr. A*, **550**, 831.
- Taylor, M.J., Keenan, G.A., Reid, K.B., Uría-Fernández, D., (2008). *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **22**, 2731.
- Tegeler, T., El Rassi, Z., (2001). *Electrophoresis*, **22**, 4281.
- *The e-pesticide manual*, British Crop Protection Council (2001). Wise & Loveys Information Services Ltd., Herts.
- Tolosa, I., Douy, B., Carvalho, F.P., (1999). *J. Chromatogr. A*, **864**, 121.
- Tomkins, B.A., Ilgner, R.H., (2002). *J. Chromatogr. A*, **972**, 183.
- Totti, S., Fernández, M., Ghini, S., Picó, Y., Fini, F., Mañes, J., Girotti, S., (2006). *Talanta*, **69**, 724.
- Tremolada, P., Finizio, A., Villa, S., Gaggi, C., Vighi, M., (2004). *Aquatic Toxicol.*, **67**, 87.
- Tsoukali, H., Theodoridis, G., Raikos, N., Grigorato, I., (2005). *J. Chromatogr. B*, **822**, 194.
- Turiel, E., Fernández, P., Pérez-Conde, C., Cámara, C., (2000a). *Analyst*, **125**, 1725.
- Turiel, E., Fernández, P., Pérez-Conde, C., Cámara, C., (2000b). *J. Chromatogr. A*, **872**, 299.
- Turiel, E., Tadeo, J.L., Cormack, P.A.G., Martín-Esteban, A., (2005). *Analyst*, **130**, 1601.
- Turiel, E., Tadeo, J.L., Martín-Esteban, A., (2007). *Anal. Chem.*, **79**, 3099.

- Turnes, M.I., Mejuto, M.C., Cela, R., (1996). *J. Chromatogr. A*, **733**, 395.
- Urruty, L., Montury, M., (1996). *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 3871.
- Valcárcel, M., Cárdenas, S., Simonet, B.M., (2007). *Anal. Chem.*, **79**, 4788.
- Valcárcel, M., Cárdenas, S., Simonet, B.M., Moliner-Martínez, Y., Lucena, R., (2008). *Trends Anal. Chem.*, **27**, 34.
- Valsamaki, V.I., Boti, V.I., Sakkas, V.A., Albanis, T.A., (2006). *Anal. Chim. Acta*, **573**, 195.
- Van Biesen, G., Bottaro, C.S., (2006). *Electrophoresis*, **27**, 4456.
- Van Breemen, R.B., Pajkovic, N., (2008). *Cancer Lett.*, **269**, 339.
- Van der Hoff, G.R., van Zoonen, P., (1999). *J. Chromatogr. A*, **843**, 301.
- Van Deursen, M.M., Beens, J., Janssen, H.G., Leclercq, P.A., Cramers, C.A., (2000). *J. Chromatogr. A*, **878**, 205.
- Veneziano, A., Vacca, G., Arana, S., De Simone, F., Rastrelli, L., (2004). *Food Chem.*, **87**, 383.
- Vidair, C.A., (2004). *Toxicol. Appl. Pharm.*, **196**, 287.
- Villa, S., Finizio, A., Díaz-Díaz, R., Vighi, M., (2003). *Water, Air and Soil Pollution*, **146**, 335.
- Viñas, P., Aguinaga, N., Campillo, N., Hernández-Córdoba, M., (2008). *J. Chromatogr. A*, **1194**, 178.
- Volante, M., Pontello, M., Valoti, L., Cattaneo, M., Bianchi, M., Colzani, L., (2000). *Pest. Manag. Sci.*, **56**, 618.
- Walorczyk, S., (2008). *J. Chromatogr. A*, **1208**, 202.
- Walorczyk, S., Gnusowski, B., (2006). *J. Chromatogr. A*, **1128**, 236.
- Wang, C.W., Pawliszyn, J., (1998). *Anal. Commun.*, **35**, 353.
- Wang, J., (2005). *Analyst*, **130**, 421.
- Wang, J.H., Zhang, Y.B., Wang, X.L., (2006). *J. Sep. Sci.*, **29**, 2330.

- Wang, L., Liang, Y., Jiang, X., (2008a). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **81**, 377.
- Wang, S., Zhao, P., Min, G., Fang, G. (2007a). *J. Chromatogr. A*, **1165**, 166.
- Wang, W.D., Huang, Y.M., Shu, W.Q., Cao, J., (2007b). *J. Chromatogr. A*, **1173**, 27.
- Wang, X., Fu, L., Wei, G., Hu, J., Zhao, X., Liu, X., Li, Y., (2008b). *J. Sep. Sci.*, **31**, 2932.
- Wang, Z., Hennion, B., Urruty, L., Montury, M., (2000a). *Food Add. Contam.*, **17**, 915.
- Wang, Z., Xiao, C., Wu, C., Han, H., (2000b). *J. Chromatogr. A*, **893**, 157.
- Weiss, B., Amler, S., Amler, R.W., (2004). *Pediatrics*, **113**, 1030.
- Wells, M.J.M., (2003). *Principles of extraction and the extraction of semivolatile organics from liquids*. En: Mitra, S. (ed.). *Sample preparation techniques in analytical chemistry*. Wiley & Sons, Inc. Nueva York.
- Wennrich, L., Popp, P., Breuste, J., (2001). *Chromatographia*, **53**, S-380.
- Worek, F., Aurbek, N., Wetherell, J., Pearce, P., Mann, T., Thiermann, H., (2008). *Toxicol.*, **244**, 35.
- Wuilloud, G.M., de Wuilloud, J.C.A., Wuilloud, R.G., Silva, M.F., Olsina, R.A., Martínez, L.D., (2002). *Talanta*, **58**, 619.
- Wuilloud, R.G., Shah, M., Kannamkumarath, S.S., Altamirano, J.C., (2005). *Electrophoresis*, **26**, 1598.
- Wu, J., Pawliszyn, J., (2001). *J. Chromatogr. A*, **909**, 37.
- Wu, Q., Li, Y., Wang, C., Liu, Z., Zang, X., Zhou, X., Wang, Z., (2009). *Anal. Chim. Acta*, **638**, 139.
- Wu, X.P., Wang, L., Xie, Z.H., Yan, C., Chen, G.N., (2007). *Chem. Res. Chinese Univ.*, **23**, 109.
- Xiao-Huan, Z., Chun, W., Shu-Tao, G., Xin, Z., Zhi, W., (2008). *Chinese J. Anal. Chem.*, **36**, 765.
- Xiao, Q., Hu, B., Yu, C., Xia, L., Jian, Z., (2006). *Talanta*, **69**, 848.
- Xiong, C., Ruan, J., Cai, Y., Tang, Y., (2009). *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **49**, 572.
- Xiong, J., Hu, B., (2008). *J. Chromatogr. A*, **1193**, 7.

- Yazdi, A.S., Razavi, N., Yazdinejad, S.R., (2008). *Talanta*, **75**, 1293.
- Ye, F.J., Xie, Z.G., Wu, X.P., Lin, X.C., (2006). *Talanta*, **69**, 97.
- Yuan, H., Mullett, W.M., Pawliszyn, J., (2001). *Analyst*, **126**, 1456.
- Yu, J., Wu, C., Xing, J., (2004). *J. Chromatogr. A*, **1036**, 101.
- Yu, L., Qin, W., Li, S.F.Y., (2005). *Anal. Chim. Acta*, **547**, 165.
- Zambonin, C.G., Quinto, M., de Vietro, N., Palmisano, F., (2004). *Food Chem.*, **86**, 269.
- Zang, X., Wang, J., Wang, O., Wang, M., Ma, J., Xi, G., Wang, Z., (2008). *Anal. Bioanal. Chem.*, **392**, 749.
- Zhao, E., Han, L., Jiang, S., Wang, Q., Zhou, Z., (2006). *J. Chromatogr. A*, **1114**, 269.
- Zhao, E., Zhao, W., Han, L., Jiang, S., Zhou, Z., (2007). *J. Chromatogr. A*, **1175**, 137.
- Zhao, F., Meng, Y., Anderson, J.L., (2008). *J. Chromatogr. A*, **1208**, 1.
- Zhou, Q., Bai, H., Xie, G., Xiao, J., (2008a). *J. Chromatogr. A*, **1188**, 148.
- Zhou, Q., Bai, H., Xie, G., Xiao, J., (2008b). *J. Chromatogr. A*, **1177**, 43.
- Zhou, Q., Ding, Y., Xiao, J., (2006a). *Anal. Bioanal. Chem.*, **385**, 1520.
- Zhou, Q., Ding, Y., Xiao, J., (2007a). *Chromatographia*, **65**, 25.
- Zhou, Q., Wang, W., Xiao, J., (2006b). *Anal. Chim. Acta*, **559**, 200.
- Zhou, Q., Xiao, J., Ding, Y., (2007b). *Anal. Chim. Acta*, **602**, 223.
- Zhou, Q., Xiao, J., Wang, W., (2006c). *J. Chromatogr. A*, **1125**, 152.
- Zhou, Q., Xiao, J., Wang, W., (2007c). *Microchim. Acta*, **157**, 93.
- Zhou, Q., Xiao, J., Wang, W., Liu, G., Shi, Q., Wang, J., (2006d). *Talanta*, **68**, 1309.
- Zhou, Q.X., Xie, G.H., Xiao, J.P., Wang, W.D., (2008c). *Chinese Chem. Lett.*, **19**, 95.

Bibliografía

- Zou, H., Huang, X., Ye, M., Luo, Q., (2002). *J. Chromatogr. A*, **954**, 5.
- Zrostlíková, J., Hajslová, J., Cajka, T., (2003). *J. Chromatogr. A*, **1019**, 173.
- Zuin, V.G., Schellin, M., Montero, L., Yariwake, J.H., Augusto, F., Popp, P., (2006). *J. Chromatogr. A*, **1114**, 180.
- Zumbado, M., Goethals, M., Álvarez-León, E.E., Luzardo, O.P., Serra-Majem, L., Cabrera, F., Domínguez-Boada, L., (2004). *Ecosistemas*, **13**, 51.
- Zumbado, M., Goethals, M., Álvarez-León, E.E., Luzardo, O.P., Cabrera, F., Serra-Majem, L., Domínguez-Boada, L., (2005). *Sci. Total Environ.*, **339**, 49.