

Curso 2011/12
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS/29
I.S.B.N.: 978-84-15910-29-9

MARÍA DEL CRISTO ASENSIO RAMOS

**Nuevos procedimientos de extracción
y determinación de plaguicidas
en muestras medioambientales**

Directores

**MIGUEL ÁNGEL RODRÍGUEZ DELGADO
JAVIER HERNÁNDEZ BORGES**



SOPORTES AUDIOVISUALES E INFORMÁTICOS
Serie Tesis Doctorales

AGRADECIMIENTOS

Es para mí un verdadero honor poder utilizar estas líneas para demostrar mi gratitud hacia las personas que me han ayudado durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral.

Me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a mis directores de Tesis, los Dres. Miguel Ángel Rodríguez Delgado y Javier Hernández Borges, por el apoyo que he recibido de ellos durante todo este tiempo. Desde hace ya muchos años, Miguel Ángel y Javi confiaron en mí para una beca de colaboración y, posteriormente, me dieron la oportunidad de realizar mi Tesis Doctoral bajo las mejores condiciones que se pueden soñar. He sentido diariamente la certeza y el optimismo de dos grandes investigadores y maravillosas personas, tanto a nivel profesional y científico, como a nivel personal. Les agradezco profundamente haberme permitido aprender de ellos tantas cosas durante esta carrera de fondo que, finalmente, hemos llevado a buen puerto.

Por supuesto, no puedo olvidar a mi pequeña familia del Laboratorio 1: Antonio, Miguel Ángel y Bárbara. Han sido el motor de todo este trabajo y, especialmente, durante estos últimos meses de la fase de redacción. Sólo cuando se trabaja a gusto y en un ambiente positivo, se consigue llegar a la meta. No olvidaré nunca estos años y todos los momentos que hemos compartido. También, como no, a todas las personas que, durante más o menos tiempo, han pasado por el laboratorio mientras he estado allí: Lidia, Alejandro, Samara y María.

Asimismo, gracias a todos los miembros del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, y en especial al resto de integrantes de nuestro grupo de investigación, Montelongo, Tere, Galindo y María Jesús, que con sus atenciones e interés en mi día a día de los últimos meses, me han ayudado a llevar adelante todo el peso de la Tesis con muchas más ganas.

De forma especial agradezco al Dr. Salvatore Fanali, por darme la oportunidad de realizar una estancia en su grupo de investigación en el Istituto di Metodologie Chimiche (IMC) del CNR de Roma. Por supuesto, hago extensible

este agradecimiento a Zeineb y a Anna, por haberme acogido con tanto cariño durante aquellos meses inolvidables. Me sentí realmente como en casa.

Al Ministerio de Educación, Cultura y Deporte de España, por la ayuda económica recibida durante estos cuatro años del programa de Formación de Profesorado Universitario.

A todos mis amigos, y especialmente a Desireé, Pablo y Javi, porque su cercanía y su incondicional amistad durante este tiempo, han sido fundamentales. Gracias por escucharme una y otra vez contando las mismas batallas del laboratorio, y por conseguir siempre sacarme una sonrisa, aún con todas las preocupaciones que ha acarreado a veces esta Tesis.

Mi mayor muestra de agradecimiento es para mi familia. Mis padres, Andrés y Rosana, han sido para mí un ejemplo de fuerza, vitalidad, superación y optimismo. Les agradezco infinitamente su amor, su paciencia, su comprensión en las épocas difíciles, su preocupación... son los mejores padres que he podido tener. A mis hermanos, Andrés y Raúl, y a Marian porque, de un modo u otro, siempre han estado ahí. Y como no, a mi prima pequeña Ángela, que con su cariño, me ha dado siempre ánimo para continuar.

Por último, y aunque no encuentre las palabras exactas para expresar lo que siento... a Giovanni. Gracias por mostrarme lo que significa la felicidad y el amor, por la perfección y la belleza de todos los momentos que vivimos juntos. Por darme la tranquilidad y la confianza que a veces me falta, por su sentido del humor que me hace reír siempre... Por tantas cosas, agradezco a esta Tesis el haberle conocido. Tan lejos... y sin embargo, siempre tan cerca.

A todos ellos, GRACIAS.

María Asensio Ramos

Mayo 2012

A mis padres
A mis hermanos
A Giovanni

ÍNDICE

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| I.1.- Plaguicidas | 3 |
| I.1.1.- Origen y desarrollo | 3 |
| I.1.2.- Contaminación de suelos y aguas por plaguicidas | 7 |
| I.1.3.- Legislación en materia medioambiental en el marco de la Unión Europea | 10 |
| I.1.3.1.- Legislación en aguas | 10 |
| I.1.3.2.- Legislación en suelos | 11 |
| I.2.- Las técnicas de separación cromatográficas y electroforéticas en el análisis de plaguicidas en muestras medioambientales | 12 |
| I.2.1.- Cromatografía de gases (GC) | 13 |
| I.2.2.- Cromatografía líquida (LC) | 15 |
| I.2.2.1.- Nano-cromatografía líquida (nano-LC) y cromatografía líquida capilar (CLC) .. | 19 |
| I.2.3.- Electroforesis capilar (CE) | 21 |
| I.2.3.1.- Electroforesis capilar en medio no acuoso (NACE) | 24 |
| I.3.- Nuevas tendencias en la preparación de muestra para el análisis de plaguicidas | 26 |
| I.3.1.- Nuevos materiales y disolventes | 29 |
| I.3.1.1.- Nanotubos de carbono (CNTs) | 29 |
| I.3.1.2.- Líquidos iónicos (ILs) | 31 |
| I.3.2.- Técnicas modernas en la preparación de muestra | 35 |
| I.3.2.1.- Extracción en fase sólida dispersiva (dSPE) y método QuEChERS | 35 |
| I.3.2.2.- Microextracción en fase líquida (LPME) | 38 |
| I.3.2.2.1.- Microextracción en gota (SDME) | 38 |
| I.3.2.2.2.- Microextracción en fase líquida con fibra hueca (HF-LPME) | 39 |
| I.3.2.2.3.- Microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME) | 42 |
| II.- OBJETIVOS | 49 |
| III.- PARTE EXPERIMENTAL | 53 |
| III.1.- Reactivos y disoluciones | 55 |
| III.2.- Materiales | 56 |
| III.3.- Equipos e instrumentos | 58 |
| III.3.1.- Equipo de CE | 58 |
| III.3.2.- Equipos de GC | 58 |
| III.3.3.- Equipo de nano-LC | 58 |
| III.3.4.- Equipo de HPLC | 59 |
| III.3.5.- Otros equipos y aparatos | 59 |
| III.4.- Programas informáticos | 60 |
| III.5.- Muestras | 60 |
| III.6.- Procedimientos experimentales | 61 |
| III.6.1.- Caracterización de las muestras de suelo | 61 |
| III.6.2.- Procedimientos experimentales en las separaciones por CE | 62 |
| III.6.3.- Procedimientos experimentales en las separaciones por GC | 64 |
| III.6.4.- Procedimientos experimentales en las separaciones por nano-LC | 66 |
| III.6.5.- Procedimientos experimentales en las separaciones por HPLC | 70 |

| | |
|--|-----|
| IV.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 75 |
| <i>IV.1.- ANÁLISIS DE PLAGUICIDAS EN AGUAS POR ELECTROFORESIS CAPILAR EN MEDIO NO ACUOSO UTILIZANDO NANOTUBOS DE CARBONO DE PARED MÚLTIPLE COMO FASES ESTACIONARIAS EN EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA</i> | 77 |
| IV.1.1.- Antecedentes | 77 |
| IV.1.2.- Separación electroforética por NACE-UV..... | 79 |
| IV.1.2.1.- Optimización de la composición del BGE | 79 |
| IV.1.2.2.- Optimización de la inyección electrocinética | 85 |
| IV.1.2.3.- Selección de la temperatura de trabajo y del voltaje aplicado | 86 |
| IV.1.3.- Optimización del procedimiento de SPE utilizando MWCNTs | 86 |
| IV.1.3.1.- Selección del disolvente de elución | 88 |
| IV.1.3.2.- Selección de la cantidad de MWCNTs | 89 |
| IV.1.3.3.- Selección del pH de la muestra | 90 |
| IV.1.4.- Aplicación del procedimiento de SPE al análisis de agua mineral..... | 91 |
| IV.1.4.1.- Validación del método..... | 92 |
| IV.1.4.1.1.- Estudio de repetibilidad y calibrado instrumental..... | 92 |
| IV.1.4.1.2.- Estudio de recuperaciones | 95 |
| IV.1.5.- Conclusiones..... | 97 |
| <i>IV.2.- ANÁLISIS DE PLAGUICIDAS EN SUELOS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES UTILIZANDO NANOTUBOS DE CARBONO DE PARED MÚLTIPLE COMO FASES ESTACIONARIAS EN EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA</i> | 99 |
| IV.2.1.-Antecedentes | 99 |
| IV.2.2.- Separación cromatográfica mediante GC-NPD | 104 |
| IV.2.3.- Muestras de suelo seleccionadas | 104 |
| IV.2.4.- Optimización de la extracción asistida por ultrasonidos | 106 |
| IV.2.5.- Modificación del procedimiento de SPE utilizando MWCNTs | 109 |
| IV.2.6.- Validación del método | 110 |
| IV.2.6.1.- Calibrado en la matriz | 111 |
| IV.2.6.2.- Estudio de recuperaciones | 115 |
| IV.2.6.3.- Estudio de precisión y exactitud..... | 117 |
| IV.2.7.- Conclusiones..... | 120 |
| <i>IV.3.- EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA DISPERSIVA CON NANOTUBOS DE CARBONO COMBINADA CON NANO-CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA PARA EL ANÁLISIS DE PLAGUICIDAS EN AGUAS</i> | 123 |
| IV.3.1.- Antecedentes | 123 |
| IV.3.2.- Separación cromatográfica mediante nano-LC-UV | 125 |
| IV.3.2.1.- Focalización en columna | 129 |
| IV.3.2.2.- Uso de una micro-precolumna | 131 |
| IV.3.2.3.- Estudio de repetibilidad y calibrado | 133 |
| IV.3.3.- Procedimiento de dSPE utilizando MWCNTs | 135 |
| IV.3.3.1.- Selección del disolvente de elución | 136 |
| IV.3.3.2.- Selección del tiempo de extracción..... | 137 |
| IV.3.3.3.- Selección del pH de la muestra acuosa | 137 |
| IV.3.3.4.- Selección de la cantidad de MWCNTs | 138 |
| IV.3.3.5.- Selección del volumen de disolvente de elución..... | 139 |
| IV.3.3.6.- Comparación con la SPE convencional..... | 140 |

| | |
|--|-----|
| IV.3.3.7.- Reutilización de los MWCNTs | 141 |
| IV.3.3.8.- Estudio de recuperaciones | 142 |
| IV.3.4.- Conclusiones..... | 144 |
| IV.4.- <i>EVALUACIÓN DEL MÉTODO QUÉCHERS MODIFICADO PARA LA EXTRACCIÓN DE PLAGUICIDAS DE DIFERENTES TIPOS DE SUELO.....</i> | 147 |
| IV.4.1.-Antecedentes | 147 |
| IV.4.2.- Separación cromatográfica mediante GC-NPD | 149 |
| IV.4.3.- Muestras de suelo seleccionadas..... | 153 |
| IV.4.4.- Aplicación del método QuEChERS | 153 |
| IV.4.5.- Validación del método | 154 |
| IV.4.5.1.- Calibrado en la matriz | 155 |
| IV.4.5.2.- Estudio de recuperaciones | 156 |
| IV.4.5.3.- Estudio de precisión y exactitud..... | 162 |
| IV.4.6.- Aplicación al análisis de muestras reales | 166 |
| IV.4.7.- Conclusiones..... | 169 |
| IV.5.- <i>EXTRACCIÓN SIMULTÁNEA DE PLAGUICIDAS Y METABOLITOS EN SUELOS MEDIANTE MICROEXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA UTILIZANDO LÍQUIDOS IÓNICOS COMO DISOLVENTES DE EXTRACCIÓN Y CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN CON DETECCIÓN POR FLUORESCENCIA</i> | 171 |
| IV.5.1.- Antecedentes | 171 |
| IV.5.2.- Separación cromatográfica mediante HPLC-FD..... | 174 |
| IV.5.2.1.- Estudio de repetibilidad y calibrado instrumental..... | 177 |
| IV.5.3.- Procedimiento IL-DLLME utilizando [HMI _m][PF ₆] ⁻ | 179 |
| IV.5.3.1.- Optimización del procedimiento | 179 |
| IV.5.3.1.1.- Diseño experimental..... | 183 |
| IV.5.3.2.- [HMI _m][PF ₆] ⁻ -DLLME-HPLC-FD de agua Milli-Q | 186 |
| IV.5.3.3.- UAE-[HMI _m][PF ₆] ⁻ -DLLME-HPLC-FD de muestras de suelo | 186 |
| IV.5.3.3.1.- Muestras de suelo seleccionadas | 186 |
| IV.5.3.3.2.- Optimización de la extracción asistida por ultrasonidos..... | 189 |
| IV.5.3.3.3.- Validación del método UAE-[HMI _m][PF ₆] ⁻ -DLLME-HPLC-FD..... | 191 |
| IV.5.4.- Procedimiento IL-DLLME utilizando [PPI _m][PF ₆] ⁻ | 195 |
| IV.5.4.1.- Síntesis y purificación del [PPI _m][PF ₆] ⁻ | 199 |
| IV.5.4.2.- Procedimiento [PPI _m][PF ₆] ⁻ -DLLME | 201 |
| IV.5.4.3.- [PPI _m][PF ₆] ⁻ -DLLME-HPLC-FD de agua Milli-Q..... | 203 |
| IV.5.4.4.- UAE-[PPI _m][PF ₆] ⁻ -DLLME-HPLC-FD de muestras de suelo..... | 203 |
| IV.5.4.4.1.- Validación del método UAE-[PPI _m][PF ₆] ⁻ -DLLME-HPLC-FD | 203 |
| IV.5.5.- Comparación entre [HMI _m][PF ₆] ⁻ y [PPI _m][PF ₆] ⁻ como disolventes de extracción en DLLME..... | 210 |
| IV.5.6.- Conclusiones..... | 211 |
| IV.6.- <i>MICROEXTRACCIÓN EN FASE LÍQUIDA CON FIBRA HUECA PARA LA DETERMINACIÓN DE PLAGUICIDAS Y METABOLITOS EN SUELOS Y AGUAS UTILIZANDO CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN CON DETECCIÓN POR FLUORESCENCIA</i> | 213 |
| IV.6.1.-Antecedentes | 213 |
| IV.6.2.- Optimización del procedimiento de HF-LPME..... | 214 |
| IV.6.2.1.- Selección del disolvente de extracción | 216 |
| IV.6.2.2.- Selección del pH de la fase acuosa | 216 |

| | |
|---|------------|
| IV.6.2.3.- Influencia de la fuerza iónica de la fase acuosa..... | 217 |
| IV.6.2.4.- Influencia de la velocidad de agitación..... | 218 |
| IV.6.2.5.- Influencia del tiempo de extracción..... | 219 |
| IV.6.2.6.- Influencia de la temperatura de extracción..... | 220 |
| IV.6.3.- UAE-HF-LPME -HPLC-FD de muestras de suelo..... | 221 |
| IV.6.3.1.- Muestras de suelo seleccionadas..... | 221 |
| IV.6.3.2.- Validación del método UAE-HF-LPME-HPLC-FD..... | 222 |
| IV.6.4.- HF-LPME-HPLC-FD de aguas..... | 227 |
| IV.6.4.1- Validación del método HF-LPME -HPLC-FD para agua..... | 227 |
| IV.6.5.- Conclusiones..... | 231 |
| V.- CONCLUSIONES GENERALES..... | 233 |
| ENGLISH SUMMARY..... | 237 |
| Chapter I.- Introduction..... | 239 |
| I.1.- Pesticides..... | 239 |
| I.2.- Chromatographic and electrophoretic separation techniques in pesticide analysis in environmental samples..... | 240 |
| I.3.-New trends in sample preparation for pesticide analysis..... | 242 |
| I.3.1.- New materials and solvents..... | 242 |
| I.3.2.- Modern sample preparation techniques..... | 244 |
| I.3.1.- Dispersive solid-phase extraction (dSPE) and the QuEChERS method..... | 244 |
| I.3.2.- Liquid-phase microextraction (LPME)..... | 244 |
| Chapter II.- Objectives..... | 245 |
| Chapter III.- Materials and methods..... | 246 |
| Chapter IV.- Results and discussion..... | 246 |
| IV.1.- Determination of pesticides in waters by non-aqueous capillary electrophoresis employing multi-walled carbon nanotubes as stationary phases in solid-phase extraction..... | 246 |
| IV.2.- Determination of pesticides in soils by gas-chromatography using multi-walled carbon nanotubes as stationary phases in solid-phase extraction..... | 248 |
| IV.3.- Multi-walled carbon nanotubes-dispersive solid-phase extraction combined with nano-liquid chromatography for the analysis of pesticides in water samples..... | 250 |
| IV.4.- Evaluation of a modified QuEChERS method for the extraction of pesticides from soils..... | 252 |
| IV.5.- Ionic liquid-dispersive liquid-liquid microextraction for the simultaneous determination of pesticides and metabolites in soils using high-performance liquid chromatography and fluorescence detection..... | 253 |
| IV.6.- Hollow-fiber liquid-phase microextraction for the determination of pesticides and metabolites in soils and water samples using high-performance liquid chromatography and fluorescence detection..... | 256 |
| Chapter V.- General conclusions..... | 258 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 261 |
| GLOSARIO..... | 289 |

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

I.- INTRODUCCIÓN

I.1.- PLAGUICIDAS

I.1.1.- ORIGEN Y DESARROLLO

La agricultura surgió hace unos 10 000 años en lo que se denominó el Creciente Fértil (Antiguo Egipto, Mesopotamia y Persia), donde se recogía una gran cantidad de semillas comestibles. En esta zona, mientras la población se asentaba, cobró éxito el cultivo de cereales y leguminosas. Poco después, en China, se comenzaba a sembrar el arroz y el mijo, mientras que, de manera independiente, se empezaron a realizar diversos cultivos en algunas partes de África (GLOBAL NETWORK FOR INFORMATION AND PROPERTIES ON AGROCHEMICALS, IUPAC).

Pronto se descubrió que estos cultivos se podían ver afectados por plagas y enfermedades que causaban grandes pérdidas, pudiendo generar en última instancia problemas de hambre en la población. Se trataba de un problema grave y, por ello, uno de los retos más importantes de la humanidad ha sido siempre, y aún lo es actualmente, la producción efectiva de alimentos, con el objetivo de aliviar la pobreza y la desnutrición (CARVALHO, 2006).

El primer uso documentado de plaguicidas data de hace unos 4500 años y fue realizado por los sumerios, que empleaban compuestos de azufre para controlar los insectos. En aquel momento, y en ausencia de industria química, cualquier producto utilizado debía ser de fácil obtención, derivado de plantas o animales o bien disponible en yacimientos naturales. Así, por ejemplo, se quemaban restos de plantas y animales para contraatacar la formación de moho mediante el humo, o se utilizaba la *mezcla de Bordeaux* (sulfato de cobre e hidróxido de calcio) como fungicida. Sin embargo, a menudo, los resultados no eran satisfactorios, debido al primitivismo de la química y a los métodos de aplicación.

A principios del siglo XIX y hasta la década de los 1940s (ver Tabla I.1), tan solo se utilizaban como plaguicidas compuestos inorgánicos y algunos derivados orgánicos del procesamiento del carbón y otros procesos industriales. De este modo, productos como los nitrofenoles, clorofenoles, la creosota, el naftaleno y los aceites de petróleo se utilizaban para combatir plagas de hongos

e insectos. No obstante, eran poco selectivos y, además, fitotóxicos.

Justo después de la Segunda Guerra Mundial (1945) y gracias al desarrollo de la síntesis orgánica, se descubrió el efecto de ciertos plaguicidas como el dicloro difenil tricloroetano (DDT), el hexaclorobenceno (BHC), el aldrín, el dieldrín, el endrín, el clordano, el paratión, el captán y el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Se trataba de productos económicos, efectivos y de amplio espectro, aunque algunas plagas se volvieron genéticamente resistentes a ellos. Además, algunas plantas y animales no objetivo se veían afectados, apareciendo los residuos en lugares imprevistos.

Tabla I.1. Cronología del desarrollo de los plaguicidas a partir el siglo XIX.

Adaptado de "LUCHA CONTRA LA CONTAMINACIÓN AGRÍCOLA DE LOS RECURSOS HÍDRICOS, ESTUDIO FAO RIEGO Y DRENAJE, ARTÍCULO 55".

| Periodo | Fuente | Ejemplo | Características |
|-----------|---|---|--|
| 1800-1945 | Productos inorgánicos, inicios de la química orgánica, productos derivados de la elaboración de gas de carbón | Sales inorgánicas, nitrofenoles, clorofenoles, naftaleno, aceites de petróleo | Poca especificidad, toxicidad para usuario y/u organismos no objetivo |
| 1945-1950 | Síntesis orgánica | Productos organoclorados: DDT, BHC, 2,4-D, ciclodienos clorados | Persistencia, toxicidad ecológica. Selectividad, efectividad |
| 1950-1970 | Síntesis orgánica específica (estructura-actividad) | Inhibidores de la colinesterasa: OPPs, carbamatos | Menor persistencia, cierta toxicidad para el usuario, algunos problemas ambientales |
| 1970-1985 | Perfeccionamiento de la síntesis orgánica específica, nuevos sistemas de selección de objetivos, manejo integrado de plagas | Piretroides sintéticos, avermectinas, imitaciones de las hormonas juveniles, plaguicidas biológicos | Resistencia, cierta falta de selectividad, elevado coste, persistencia variable |
| 1985-hoy | Genética | Organismos obtenidos por ingeniería genética. Síntesis de nuevos plaguicidas | Mutaciones y fugas, perturbación de la ecología microbiológica, monopolio de los productos |

OPP: plaguicidas organofosforados.

A lo largo de los años 1950s se introdujeron los plaguicidas organofosforados (OPPs) y los carbamatos, de menor persistencia y más específicos. Los alimentos eran más baratos y los plaguicidas eran más seguros que sus antecesores. A pesar de todo, no fue hasta la década de los 1960s, con la publicación del libro *Silent spring* (Primavera silenciosa) de Rachel Carson (CARSON, 1962) como detonante, cuando se empezó a tomar consciencia de los problemas medioambientales que podría provocar el uso indiscriminado de estos productos.

El desarrollo de los plaguicidas continuó y en las décadas de los 1960s, los 1970s y los 1980s se introdujeron familias como las sulfonilureas, las imidazolinonas, las dinitroanilinas, las ciclohexanodionas y los ariloxifenoxipropionatos como herbicidas. Por otra parte, surgieron insecticidas como la tercera generación de los piretroides, las avermectinas, las benzoilureas y las esporas y cristales de proteína producidos por la bacteria B_t (*Bacillus thuringiensis*) y, además, fungicidas como los triazoles, las morfolinas, los imidazoles, las pirimidinas y las dicarboxamidas. En los años 1990s, se implantaron en el mercado los herbicidas de las familias de las triazolopirimidinas, tricetonas e isoxazoles, los fungicidas como las estrobirulinas y azolonas y los insecticidas cloronicotinilos, espinosinas, fiproles y diacilhidrazinas.

Como se puede observar, la cercanía del siglo XX trajo consigo la evolución hacia nuevas clases de plaguicidas altamente selectivos, de menor toxicidad, menor frecuencia de uso y bajas dosis de aplicación (g/ha). Se entró en la era de la ingeniería genética, produciendo cultivos resistentes a determinadas plagas o incluso a ciertos herbicidas. Se introdujo además el manejo integrado de plagas, que combina prácticas y métodos complementarios en los que se considera que el cultivo puede convivir con un cierto nivel de plaga de manera que no se produzcan pérdidas económicas (PRINCIPIOS DEL MANEJO INTEGRADO DE PLAGAS, AGENCIA PARA LA PROTECCIÓN MEDIOAMBIENTAL DE LOS ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA (EPA)). En ella se realizan prácticas preventivas de cultivo, controles mecánicos, controles biológicos introduciendo especies que atacan a las plagas y, en última instancia, se utilizan, aunque en menor medida y de forma muy controlada, plaguicidas. De esta forma se permite el espaciamiento de las aplicaciones de estos productos.

Como resultado, la ciencia y la investigación han provisto a la agricultura a lo largo del tiempo de nuevos productos para controlar las plagas, procurando que éstos ofrecieran un mejor comportamiento medioambiental y seguridad para los consumidores y aplicadores, sobre todo en la segunda mitad del s. XX y principios del actual s. XXI (ver Tabla I.2 a modo de ejemplo).

Tabla I.2.- Relación de algunos insecticidas, fungicidas y herbicidas utilizados históricamente, sus LD₅₀ y el año de descubrimiento.

Adaptado de "A HISTORY OF CROP PROTECTION AND PEST CONTROL IN OUR SOCIETY".

| Insecticidas | LD₅₀ oral (mg/kg) (mamíferos) | Descubrimiento |
|-----------------------|---|-----------------------|
| Nicotina | 50-60 | 1690 |
| <i>Verde de París</i> | 22 | 1880s |
| DDT | 113 | 1930s |
| Clorpirifos | 86-270 | 1970s |
| Indoxacarb | 687-1867 | 2000s |
| Fungicidas | LD₅₀ oral (mg/kg) (mamíferos) | Descubrimiento |
| Sulfato de cobre | 472 | 1880s |
| Pentaclorofenol | 50-500 | 1930s |
| Captán | 9000 | 1940s |
| Clorotalonil | >10 000 | 1970s |
| Vinclozin | >16 000 | 1990s |
| Herbicidas | LD₅₀ oral (mg/kg) (mamíferos) | Descubrimiento |
| Ácido arsénico | 48-100 | 1900s |
| Amina de 2,4-D | 1492 | 1940s |
| Atrazina | 1600 | 1050s |
| Etil-fenoxaprop | 2565 | 1980s |
| Nicosulfurón | >5000 | 1990s |

LD₅₀: cantidad de ingrediente activo en miligramos utilizado por kilogramo de animal de prueba (normalmente ratas) que causa la muerte del 50% de los animales, con una sola dosis.

A pesar de que todavía hoy en día se sintetizan y se utilizan grandes cantidades de plaguicidas, determinados países (incluyendo la Unión Europea, UE), se han marcado como principal objetivo en esta materia el conseguir el llamado "*residuo cero de plaguicidas*" como un paso más en la evolución del manejo integrado de plagas. Sin embargo, se trata de un objetivo a largo plazo ya que desde muchos puntos de vista, los beneficios de los plaguicidas son reales y proporcionan una rápida, a la vez que efectiva, eliminación de las plagas.

I.1.2.- CONTAMINACIÓN DE SUELOS Y AGUAS POR PLAGUICIDAS

Cuando un plaguicida es aplicado sobre un cierto cultivo, inevitablemente parte de éste va a parar al suelo, así como a otros compartimentos medioambientales. En la Tabla I.3 se muestran los principales procesos físicos, químicos y biológicos que regulan, por una parte, la movilidad y por otra, la degradación de los plaguicidas en el medio ambiente, lo que determina el destino final del mismo. Éste depende, al igual que el de cualquier otra molécula, tanto de sus características físico-químicas como de las del medio que les rodea.

Tabla I.3.- Procesos de movimiento y degradación de los plaguicidas en el medioambiente.
Extraída de Pierzynski y cols. (2000).

| Proceso | Consecuencia | Factores |
|--|--|---|
| <i>Movilidad (procesos que no modifican la estructura química)</i> | | |
| Deriva física | Movimiento debido al viento | Velocidad del viento |
| Volatilización | Pérdida debida a evaporación de los plaguicidas en el suelo, plantas y aguas | Presión de vapor, velocidad del viento, temperatura |
| Adsorción | Traslado debido a interacciones con los suelos, plantas y sedimentos | Contenido de arcillas, materia orgánica, humedad |
| Absorción | Captación por parte de las raíces de las plantas o por ingestión animal | Transporte en la membrana celular, tiempo de contacto |
| Arrastre | Movimientos horizontales y verticales a través del suelo | Textura, contenido de agua, de arcillas y de materia orgánica |
| Erosión | Acción del viento y el agua | Lluvias, velocidad del viento, contenido de materia orgánica y arcillas |
| <i>Degradación (procesos que modifican la estructura química)</i> | | |
| Fotoquímica | Absorción de radiación solar (UV) | Estructura química, intensidad y duración de la exposición |
| Microbiana | Degradación por microorganismos | Factores ambientales (pH, humedad, temperatura) y contenido de materia orgánica |
| Química | Hidrólisis y reacciones redox | Factores ambientales y modificaciones del pH |
| Metabólica | Adsorción por parte de plantas o animales | Capacidad de adsorción, metabolismo, interacciones con microorganismos |

Entre las propiedades más importantes de un plaguicida que pueden predecir su comportamiento en el agua y su movilidad en el suelo se encuentra

la solubilidad. Como es bien sabido, ésta depende del pH, de la temperatura y de la fuerza iónica del medio, así como de la presencia de otras sustancias orgánicas, como la propia materia orgánica disuelta. Frecuentemente se utiliza la constante de solubilidad (K_{ps}) para estimarla, así como el coeficiente de partición octanol/agua (K_{ow}) (BLASIOLI Y COLS., 2011).

Por otra parte, la volatilidad es una segunda propiedad significativa, responsable de la transferencia de los plaguicidas desde el suelo y las aguas hacia la atmósfera. Es función de diferentes factores y se suele expresar mediante la constante de Henry (K_H) (LUCHA CONTRA LA CONTAMINACIÓN AGRÍCOLA DE LOS RECURSOS HÍDRICOS, ESTUDIO FAO RIEGO Y DRENAJE, ARTÍCULO 55). La volatilización de un plaguicida desde el agua depende por una parte de su presión de vapor, su solubilidad, interacción con materiales en suspensión y sedimentos, así como de las propiedades físicas de la masa acuosa. Sin embargo, en la volatilización de un plaguicida desde el suelo intervienen además otras características inherentes de la propia molécula, como su estructura y la capacidad de adsorción-desorción, propiedades del suelo como su contenido en humedad, porosidad, densidad, materia orgánica y arcillas, y factores ambientales como la temperatura, la humedad y la velocidad del viento.

Otro factor importante para entender el impacto medioambiental que puede tener un plaguicida es su persistencia. Normalmente se expresa en base al tiempo de semidesintegración o vida media ($t_{1/2}$) (COSCOLLA, 1993). En este sentido, aquellos plaguicidas con un $t_{1/2}$ bajo se suponen poco persistentes y de bajo impacto, siempre y cuando sus productos de degradación no tengan una elevada toxicidad.

A pesar de todo lo comentado anteriormente, se puede considerar que el elemento más importante que afecta a la contaminación del suelo y el agua por un plaguicida, es su habilidad para adsorberse así como su tendencia a desorberse de los suelos y sedimentos (ARIAS-ESTÉVEZ Y COLS., 2008). Estos procesos dependen de las características físico-químicas del plaguicida, pero igualmente, y de manera importante, del propio suelo. En general, el hecho de que la materia orgánica tenga gran afinidad química por las moléculas de plaguicidas y que las arcillas tengan una gran área superficial y cargas intercapa, hacen que los suelos sean buenos adsorbentes para las moléculas orgánicas. Además, los

plaguicidas pueden interactuar como especies neutras, ácidas o básicas de forma que en el suelo pueden tener lugar interacciones de todo tipo: Van der Waals, enlaces de hidrógeno, dipolo-dipolo, intercambio iónico, enlaces covalentes, reacciones ácido-base, intercambio de ligandos, interacciones hidrofóbicas, etc. Todo esto asegura una interacción verdaderamente compleja, como se puede intuir a partir de la Figura I.1.

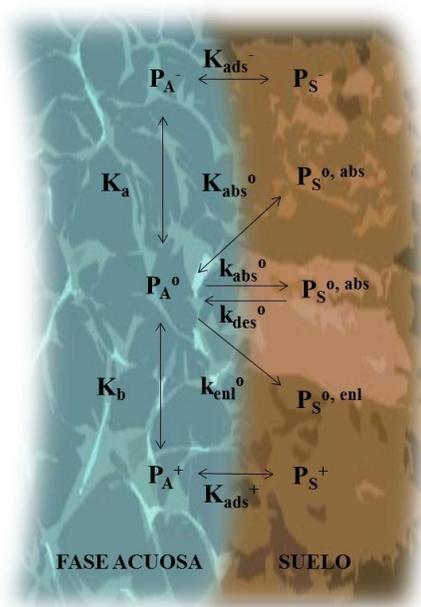


Figura I.1.- Diagrama esquemático de los equilibrios de absorción (K_{abs}), adsorción (K_{ads}) y ácido-base (K_a , K_b), así como de las reacciones de absorción (k_{abs}), desorción (k_{des}) y de enlace (k_{enl}) que pueden experimentar los plaguicidas en la interfase agua-suelo. Adaptado de Arias-Estévez y cols. (2008).

Además de los anteriores, existen otros procesos importantes que influyen en el destino de un plaguicida. Entre ellos, la biodegradación por microorganismos o la fotólisis directa o indirecta juegan un papel importante en la degradación tanto en la superficie del suelo como en ambientes acuáticos. Igualmente, existen evidencias de que los productos químicos aplicados en la superficie del suelo pueden ser transportados rápidamente a las aguas subterráneas mediante vías de flujo preferencial (rutas específicas del flujo de agua de lluvia o riego) (ELLIOTT Y COLS., 2000), co-transporte con la materia coloidal (WORRALL Y COLS., 1999) o la combinación de ambos. Evidentemente, éste último hecho constituye un verdadero problema de contaminación.

A pesar de que algunos plaguicidas puedan ser degradados en días por los

microorganismos del suelo o acumularse durante años dadas sus complejas interacciones, su destino medioambiental puede variar enormemente. Además, sus posibles metabolitos o productos de transformación, que en este campo no se conocen todo lo que se debiera, pueden estar presentes a altas concentraciones. En general, estos metabolitos son menos tóxicos que el plaguicida del que provienen, pero existen ciertas excepciones. Además, su comportamiento es diferente, mostrando una gran movilidad ambiental, lo que puede aumentar su impacto negativo en el medioambiente (ANDREU Y PICÓ, 2004). Como consecuencia, es necesario tener en cuenta también los productos de degradación en los procesos de riesgo asociados a los plaguicidas.

I.1.3.- LEGISLACIÓN EN MATERIA MEDIOAMBIENTAL EN EL MARCO DE LA UNIÓN EUROPEA

Desde inicios de los años 1960s, pero sobre todo durante la última década, la UE ha ido contemplando medidas correctoras ligadas a problemas medioambientales concretos, estableciendo disposiciones transversales o integradas en otras políticas. Estas medidas incluyen el establecimiento de leyes/normativas para luchar contra el cambio climático, en favor del desarrollo sostenible, la gestión de residuos, la contaminación atmosférica, la protección de la naturaleza y de la biodiversidad, entre otros. Como era de esperar, las aguas y el suelo no han quedado fuera de esta lucha por la calidad medioambiental.

I.1.3.1.- LEGISLACIÓN EN AGUAS

Una de las directivas de la UE más importantes en este ámbito es la *Directiva marco del agua* (DMA) 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 23 de octubre de 2000, que vela por la protección y la gestión del agua abarcando el control de las aguas interiores superficiales, subterráneas, de transición y costeras. Sus objetivos principales son la prevención y reducción de la contaminación, la promoción del uso sostenible del agua, la protección del medio ambiente, la mejora de los ecosistemas acuáticos y la atenuación del efecto de inundaciones y sequías. En última instancia, se pretende alcanzar un estado óptimo ecológico y químico de todas las aguas comunitarias para el año 2015.

Dentro de este marco se han establecido algunos actos modificativos, entre

los que cabe destacar la Decisión 2455/2001/CE, de 20 de noviembre de 2001, por la que se aprueba la lista de sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas. Entre ellas se encuentran algunos plaguicidas, concretamente alaclor, atrazina, clorofenvinfos, clorpirifos, diurón, endosulfán, BHC, lindano, isoproturón, pentaclorobenceno, pentaclorofenol, simazina y trifluralina.

Por otra parte, en el artículo 7 de la DMA, referente a las aguas utilizadas para la captación de agua potable, se indica que los Estados miembros deben velar por que, en el régimen de depuración de aguas que se aplique y de conformidad con la normativa comunitaria, el agua obtenida cumpla los requisitos de la Directiva 98/83/CE, de 3 de noviembre de 1998, relativa a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano. En lo que se refiere a materia de plaguicidas, la DMA establece en la parte B del anexo I que la concentración de un plaguicida individual no puede superar los 0,10 µg/L, mientras que el total de plaguicidas no puede superar los 0,50 µg/L.

En este sentido, y a pesar de que se están realizando esfuerzos para evitar la presencia de residuos de plaguicidas en las aguas, es de vital importancia la ejecución de programas de monitorización que permitan asegurar un consumo seguro de las mismas. También a este respecto, el desarrollo de nuevas metodologías para su determinación en este tipo de matrices son bienvenidas, siempre que se alcancen los niveles de concentración requeridos por la legislación vigente.

I.1.3.2.- LEGISLACIÓN EN SUELOS

La UE, mediante sus diferentes políticas sobre el agua, la agricultura, los desechos, compuestos químicos como los plaguicidas, etc. contribuye de forma indirecta a la protección del suelo, que es, de hecho, un recurso frágil y limitado que se ve extremadamente afectado por distintos factores como la erosión, la pérdida de materia orgánica o la contaminación. Sin embargo, dado que esas directivas o leyes tienen otros objetivos y ámbitos de actuación, no son suficientes para asegurar un nivel adecuado de protección de los suelos europeos. Por ello, la UE decidió adoptar hace ya algunos años, la llamada *Estrategia temática para la protección del suelo*, mediante la comunicación COM (2006) 231, de 22 de septiembre de 2006 (no publicada en el Diario Oficial de la

UE), que propone una Directiva marco sobre el suelo, así como objetivos comunes para prevenir su degradación, preservar las funciones de éste y rehabilitar los suelos degradados. Esta estrategia junto con la propuesta COM (2006) 232 del Parlamento Europeo y del Consejo que forma parte de ella, prevé la definición de zonas de riesgo y terrenos contaminados, así como la rehabilitación de los mismos.

A pesar de los esfuerzos por parte de diversas presidencias de la UE, el Consejo no ha podido alcanzar, de momento, una mayoría cualificada para el desarrollo de esta propuesta legislativa. Recientemente, el 13 de febrero de 2012, la UE publicó, mediante una comunicación, un informe político sobre la aplicación de la *Estrategia temática para la protección del suelo* (COM (2012) 46). En él se explican las acciones que se están llevando a cabo para establecer los cuatro pilares en los que se dividió la estrategia: sensibilización, investigación, integración y legislación. Se indica asimismo que en el Consejo de Medio Ambiente de marzo de 2010, una minoría de Estados miembros bloqueó la situación alegando razones de subsidiariedad, costes excesivos y cargos administrativos. Desde entonces, no se ha avanzado más en la cuestión y la propuesta sigue ante el Consejo. Por último, se invita al Parlamento Europeo, al Consejo, al Comité Económico y Social Europeo y al Comité de las Regiones a que presenten sus observaciones sobre el informe.

Por todo ello, es de especial importancia el desarrollo de metodologías altamente eficaces que, aunando una preparación de muestra eficiente con una técnica de separación sensible y robusta, sean capaces de determinar residuos de estos compuestos, así como de sus metabolitos, en muestras medioambientales a los niveles demandados.

I.2.- LAS TÉCNICAS DE SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICAS Y ELECTROFORÉTICAS EN EL ANÁLISIS DE PLAGUICIDAS EN MUESTRAS MEDIOAMBIENTALES

Los plaguicidas no se pueden tratar como un grupo homogéneo de contaminantes orgánicos, ya que difieren en gran medida unos de otros en sus propiedades fisicoquímicas. Cuando se desarrolla una metodología para su determinación, la selección de una técnica de separación depende principalmente de las propiedades de los analitos, así como de los requerimientos del analista.

I.2.1.- CROMATOGRAFÍA DE GASES (GC)

Hoy en día, la cromatografía de gases (GC) es, sin duda alguna, la técnica de separación más empleada en el análisis de plaguicidas. En particular, más del 60% de los plaguicidas registrados y sus metabolitos pueden ser detectados por GC (SANTOS Y GALCERÁN, 2002), dada su volatilidad relativamente alta y gran estabilidad a altas temperaturas. Familias de plaguicidas importantes que cumplen estas condiciones son los organoclorados (OCPs), los OPPs, los organonitrogenados (ONPs) o los organosulfurados (OSPs). La Tabla I.4 muestra algunos ejemplos representativos del uso de la GC con diferentes detectores para la determinación de plaguicidas en muestras medioambientales.

Tabla I.4.- Ejemplos representativos de la aplicación de la GC con distintos detectores para la determinación de plaguicidas en muestras de interés medioambiental.

| Plaguicidas | Muestra | Pretratamiento | Detector | Referencia |
|---------------------------|---|----------------------------|-------------------|--------------------------------|
| 18 OCPs | Agua subterránea | SPME | ECD | RAPOSO JÚNIOR Y RÉ-POPPI, 2007 |
| 13 OCPs | Suelo | LSE-SPE | ECD | SSEBUGERE Y COLS., 2010 |
| 50 de diferentes familias | Agua de desagüe | SPME | NPD EI-MS | EISERT Y LEVSEN, 1995 |
| 5 Triazinas | Suelo | MAE | NPD | HOOPERBRUGGE Y COLS., 1997 |
| 6 OSPs | Suelo, agua de granja, de río y de pozo | UAE, HF-LPME o DLLME | FPD | XIONG Y HU, 2008 |
| 17 OPPs, 18 OCPs | Agua de río | SPE | FPD μ -ECD | ZULIN Y COLS., 2002 |
| 20 de diferentes familias | Suelo | SFE | CID-MS/MS (IT) | GONÇALVES Y COLS., 2006 |

CID: disociación inducida por colisión. DLLME: microextracción líquido-líquido dispersiva. ECD: detector de captura electrónica. FPD: detector de fotometría de llama. HF-LPME: microextracción en fase líquida con fibra hueca. IT: trampa de iones. LSE: extracción líquido-sólido. MAE: extracción asistida por microondas. MS: espectrometría de masas. NPD: detector de nitrógeno-fósforo. SFE: extracción con fluidos supercríticos. SPE: extracción en fase sólida. SPME: microextracción en fase sólida. UAE: extracción asistida por ultrasonidos.

Los detectores más ampliamente utilizados han sido el de captura electrónica (ECD) para la detección de plaguicidas halogenados (ZULIN Y COLS., 2002; RAPOSO JÚNIOR Y RÉ-POPPI, 2007; SSEBUGERE Y COLS., 2010), el de nitrógeno-fósforo (NPD) para la detección de triazinas, OPPs y ONPs (EISERT Y LEVSEN, 1995; HOOPERBRUGGE Y COLS., 1997) y el de fotometría de llama (FPD) para OPPs y OSPs (ZULIN Y COLS., 2002; XIONG Y HU, 2008). En general, la GC posee un gran poder de resolución y una alta

sensibilidad y selectividad cuando es acoplada a estos detectores selectivos. Sin embargo, cuando se acopla a la detección por espectrometría de masas (MS), la técnica resulta mucho más sensible, versátil y selectiva. Es más, el acoplamiento GC-MS proporciona información analítica inequívoca para el análisis de muestras medioambientales que contengan plaguicidas que puedan ser determinados por esta técnica (SANTOS Y GALCERÁN, 2002). De hecho, la combinación GC-MS ha sido utilizada para el análisis de muestras de suelo sobre todo usando como técnica de ionización el impacto electrónico (EI) (EISERT Y LEVSEN, 1995) y la trampa de iones (IT) como analizador para realizar MS en tándem (ANDREU Y PICÓ, 2004; GONÇALVES Y COLS., 2006).

De forma general, la GC es una herramienta poderosa y popular. Sin embargo requiere, en muchos casos, tiempos de análisis largos. En este sentido, ya a principios de los años 1960s se demostró el potencial de columnas de pequeño diámetro interno (d.i.) para aumentar el rendimiento de la GC (DESTY, 1965), además del uso de columnas multicapilares (VAN LIESHOUT Y COLS., 1999), columnas capilares cortas (BICCHI, Y COLS., 2001), columnas anchas operadas con vacío a la salida (VAN DEURSEN Y COLS., 2000) o programas de temperatura acelerados (DALLÜGE Y COLS., 2002b).

Hoy en día, se habla de GC rápida cuando ésta se desarrolla con tiempos de análisis más cortos que los obtenidos en GC convencional, manteniendo un poder de resolución aceptable. Esto se puede conseguir variando un gran número de parámetros experimentales como la longitud de la columna, su d.i., el tipo de fase estacionaria, el espesor de la misma, la naturaleza del gas portador, su velocidad lineal o la temperatura del horno y las rampas empleadas (MATISOVÁ Y DŮMŤTŮROVÁ, 2003).

Posiblemente, el uso de columnas de menor d.i. y menor longitud respecto a las convencionales, constituye el mejor modo de reducir los tiempos de análisis. Basada en el d.i. de la columna, la GC se puede agrupar en tres tipos: convencional (d.i. $\geq 0,25$ mm), rápida (d.i. entre 0,10 y 0,18 mm) y ultra-rápida (d.i. $\leq 0,05$ mm), pudiendo requerir esta última instrumentación específica. Todas estas columnas de diferente d.i. se encuentran comercialmente disponibles con diferentes fases estacionarias, lo que convierte, al menos a la GC rápida, en una

opción asequible. Como cabía esperar, esta aproximación ha adquirido una gran importancia en el análisis de residuos de plaguicidas, debido a la gran utilidad práctica del empleo de metodologías rápidas como ésta en el análisis de rutina (DÖMÖTÖROVÁ Y MARISOVÁ, 2008).

Por otra parte, la GC multidimensional (MDGC), tanto en lo que se conoce internacionalmente como modos *heart cut* (H/C MDGC) y *comprehensive* (GCxGC), proporciona una excelente caracterización de muestras complejas volátiles y semivolátiles, lo que en muchos casos es poco probable conseguir mediante la GC monodimensional. Concretamente, la GCxGC proporciona una mejor resolución y selectividad en la separación, con respecto a la GC convencional, así como la obtención de la separación en dos dimensiones (2D) de la muestra completa (MARRIOT Y COLS., 2012). Las diferentes combinaciones posibles en cuanto a las dos columnas, y los métodos de detección la hacen tremendamente versátil para un gran número de aplicaciones (HERRERO Y COLS., 2009). El número de publicaciones científicas relacionadas con la determinación de plaguicidas por GCxGC es todavía relativamente pequeño, pero suficiente para demostrar sus ventajas potenciales por encima de la GC en una dimensión. En este sentido, prácticamente todas las aplicaciones han sido desarrolladas en el campo agroalimentario (DALLÜGE Y COLS., 2002a; KHUMMUENG Y COLS., 2006; BANERJEE Y COLS., 2008) y muy pocas en el campo medioambiental (MACEDO DA SILVA Y COLS., 2011).

I.2.2.- CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA (LC)

Como es bien conocido, la GC no es adecuada para compuestos de baja volatilidad, termolábiles y con una polaridad muy alta. Además, frecuentemente, algunos metabolitos de plaguicidas que pueden ser analizados por GC, sólo pueden ser determinados por cromatografía líquida (LC) debido a su baja volatilidad y propiedades iónicas (ANDREU Y PICÓ, 2004). Esto ha estimulado, sobre todo durante las últimas décadas, el desarrollo de metodologías que emplean la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) como principal técnica de separación.

La LC, en teoría, puede ser aplicada a cualquier compuesto orgánico, sea cual sea su volatilidad o estabilidad térmica. Además, el hecho de poder

modificar tanto la fase estacionaria como la fase móvil dota a la técnica de una gran versatilidad. La Tabla I.5 muestra algunos ejemplos representativos del uso de la LC con diferentes detectores para la determinación de plaguicidas en muestras medioambientales.

Tabla I.5.- Ejemplos representativos de la aplicación de la HPLC con distintos detectores para la determinación de plaguicidas en muestras de interés medioambiental.

| Plaguicidas | Muestra | Pretratamiento | Detector | Referencia |
|---------------------------|-----------------------|----------------|-------------------------|-------------------------------|
| 6 Piretroides | Agua de río | UAE-DLLME | UV | YAN Y COLS., 2010 |
| 8 OPPs | Suelo | MAME | UV | PADRÓN-SANZ Y COLS., 2005 |
| 4 Benzimidazoles | Suelo | MAME | FD | HALKO Y COLS., 2006 |
| 6 Carbamatos | Suelo | UAE | FD (con derivatización) | SÁNCHEZ-BRUNETE Y COLS., 2003 |
| 32 de diferentes familias | Agua y suelo agrícola | UAE-SPE | ESI-MS (Q) | BELMONTE VEGA Y COLS., 2005 |
| 53 de diferentes familias | Agua de lluvia | SPE | ESI-MS (QqQ) | BOSSI Y COLS., 2002 |

DLLME: microextracción líquido-líquido dispersiva. ESI: ionización por electrospray. FD: detección por fluorescencia. MAME: extracción micelar asistida por microondas. Q: cuadrupolo. QqQ: triple cuadrupolo. UV: ultravioleta.

En cuanto a los detectores, la detección ultravioleta (UV) (PADRÓN-SANZ Y COLS., 2005; YAN Y COLS., 2010) y la MS (BOSSI Y COLS., 2002; BELMONTE VEGA Y COLS., 2005) se han utilizado ampliamente. En el caso del análisis de suelos, cuando se utiliza HPLC en fase inversa con detección UV, los compuestos húmicos interfieren de manera importante en la cercanía de los 220 nm, causando variaciones importantes y pronunciadas de la línea base (ANDREU Y PICÓ, 2004). Por su parte, la detección fluorescente (FD) ha sido poco utilizada (SÁNCHEZ-BRUNETE Y COLS., 2003; HALKO Y COLS., 2006), ya que el número de plaguicidas con fluorescencia nativa es muy reducido y se requiere una etapa de derivatización que se puede llevar a cabo en los modos precolumna (en línea o fuera de línea) o poscolumna (KOLLER Y ECKERT, 1997).

A pesar de que la HPLC se puede considerar como una técnica madura, sigue experimentando grandes avances con el objetivo de mejorar la calidad de la separación. En lo que respecta a la fase móvil, de forma general, se ha procurado emplear aditivos menos contaminantes que los utilizados clásicamente y que mejoren la selectividad. En este sentido, destaca el empleo de

los líquidos iónicos (ILs), de los que se discutirá en la sección I.3.1.2, como aditivos de la fase móvil (LIU Y COLS., 2005). Éstos han demostrado actuar como óptimos agentes bloqueantes de los grupos silanol libres que producen baja eficacia y asimetría de los picos.

Hoy en día, y al igual que en la GC, la principal tendencia en la técnica está enfocada hacia la disminución de los tiempos de análisis. En este sentido, destaca el desarrollo de la llamada LC rápida, que implica la utilización de columnas monolíticas, el uso de la LC ultra rápida (UHPLC) empleando partículas de diámetro externo (d.e.) inferior a 2 μm (sub-2 μm) o la tecnología *core-shell*. Además, para el análisis de muestras complejas (biológicas, agroalimentarias o medioambientales), el acoplamiento de la UHPLC con la MS proporciona una herramienta analítica muy poderosa (GUILLARME Y COLS., 2010).

Por una parte, las columnas monolíticas son una buena alternativa para llevar a cabo separaciones más rápidas utilizando velocidades de flujo más altas que las que se pueden considerar normales en las columnas empaquetadas (OLSEN Y COLS., 2006), aunque es importante destacar que el consumo de fase móvil es considerable. Este tipo de columnas están formadas por un lecho poroso continuo polimérico que proporciona poros ($\sim 2 \mu\text{m}$) con baja resistencia al flujo y mesoporos ($\sim 13 \text{ nm}$), lo que dota al material de una gran permeabilidad y bajas contrapresiones (IKEGAMI Y TANAKA, 2004). A pesar de que se pueden fabricar en el laboratorio, utilizando incluso monolitos basados en polímeros de impresión molecular (MIPs), actualmente su gran desventaja es la no disponibilidad comercial. Hasta el momento, y a pesar de sus ventajas, las aplicaciones de las columnas monolíticas al análisis de plaguicidas son muy reducidas (ASPERGER Y COLS., 2002; CHOCHOLOUS Y COLS., 2008; BEALE Y COLS., 2010).

Seguramente hoy en día, el enfoque más adecuado para llevar a cabo separaciones rápidas, eficientes y económicas es el uso de la UHPLC (NGUYEN Y COLS., 2006). El empleo de partículas sub-2 μm permite, en comparación con las columnas convencionales rellenas con partículas de aproximadamente 5 μm , un aumento de 3 veces la eficacia para columnas de la misma longitud (NGUYEN Y COLS., 2006). Asimismo, la utilización de partículas de sílice *core-shell* proporciona una mejora de la eficacia con respecto a partículas totalmente porosas en LC en

fase inversa, así como una disminución de la contrapresión que las hace similares a las partículas sub-2 μm . Este tipo de partículas, que consisten en un centro fusionado cubierto de una capa de sílice porosa, se encuentran en la actualidad disponibles comercialmente con un d.e. de unos 2,6 μm .

Respecto a la utilización de otras fases estacionarias, cabe destacar aún el dominio de las fases ligadas, especialmente las C_{18} y C_8 (OLSEN Y COLS., 2006). Sin embargo, las nuevas tendencias incluyen fases estacionarias como las utilizadas para la LC de interacción hidrófila (HILIC), fases ligadas fluoradas (perfluoroalquil y pentafluorofenil), amida y fenilo, fases mixtas, carbón negro grafitizado (GCB), nanotubos de carbono (CNTs), fases estacionarias quirales, etc. Además, muchas de estas fases se encuentran disponibles en tamaños sub-2 μm y de tipo *core-shell* de 2,6 μm , proporcionando selectividades complementarias. Todas estas nuevas tendencias han encontrado aplicación también en el campo medioambiental, incluyendo la determinación de plaguicidas, especialmente en diferentes tipos de agua (NÚÑEZ Y COLS., 2012).

En cuanto a otro tipo de avances, se puede mencionar el uso de la LC a alta temperatura como alternativa para la disminución de los tiempos de análisis y del consumo de disolventes (TEUTENBERG, 2009). Sin embargo, la inexistencia de un gran número de fases estables en estas condiciones, así como la posible degradación de los compuestos analizados, no ha promovido tanto su uso. Otra tendencia actual más instaurada es la LC multidimensional, también en los modos H/C MDLC y *comprehensive LCxLC*, que proporciona un mejor poder de resolución para mezclas complejas (ERNI Y FREI, 1978; PAVEL, 2012). Esta aproximación se ha utilizado ampliamente en proteómica desde hace varias décadas (TANG Y COLS., 2008; ZHANG Y COLS., 2010a; DONATO Y COLS., 2011), mientras que en el campo de los plaguicidas, las aplicaciones son todavía relativamente escasas y se han desarrollado, sobre todo, en el ámbito agroalimentario (HERRERO Y COLS., 2009).

La principal desventaja de la HPLC es el gran consumo de disolventes que implica. La disminución del d.i. de las columnas analíticas con respecto a las utilizadas en la HPLC clásica y, por consiguiente, la disminución de la velocidad de flujo, es un campo que se ha venido investigando desde hace algunas décadas y que ha proporcionado interesantes resultados, como se indicará a continuación.

I.2.2.1.- NANO-CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA (NANO-LC) Y CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CAPILAR (CLC)

La miniaturización de las columnas en LC fue durante muchos años un objetivo a lograr, llevando a cabo estudios teóricos, tecnológicos y metodológicos. Como resultado se preveía la obtención de mejores eficacias de separación, tiempos de análisis más cortos y un mejor acoplamiento con la MS debido a la disminución de la velocidad de flujo.

Desde la introducción de la cromatografía líquida capilar (CLC) en 1967 (HORVATH Y COLS., 1967) y de la nanocromatografía líquida (nano-LC) en 1988 (KARLSSON Y NOVOTNY, 1988) y hasta los últimos años, ambas se han establecido como técnicas alternativas a la HPLC convencional, hasta el punto de que actualmente compiten con ella. A pesar de que hasta ahora no se ha encontrado una definición clara, se ha sugerido en muchas ocasiones que la principal diferencia entre estas dos técnicas se establece normalmente en el d.i. de la columna (VISSERS Y COLS., 1997). Cuando se sitúa entre 10-100 μm , la técnica se denomina nano-LC, mientras que a partir de 100 y hasta 500 μm , pasa a denominarse CLC.

Las columnas capilares se rellenan con las mismas fases estacionarias utilizadas en HPLC, pudiendo ser partículas de 3-5 μm de d.e. (CHÁFER-PERICÁS Y COLS., 2006), soportes monolíticos (NISCHANG Y COLS., 2010), partículas sub-2 μm (D'ORAZIO Y COLS., 2012), etc. El uso de columnas de tan bajo d.i. implica la obtención de flujos del orden de $\mu\text{L}/\text{min}$ o nL/min , lo que reduce en gran medida el gasto de disolventes, a la vez que se consiguen tiempos de análisis cortos y buenas eficacias de pico (HERNÁNDEZ-BORGES Y COLS., 2007).

Sin embargo, la generación de flujos de este orden no es algo trivial. Originalmente, aunque todavía hoy en día se hace uso de ellos, se utilizaron los denominados sistemas de *split-flow* (flujo dividido) de fabricación sencilla a nivel de laboratorio (HERNÁNDEZ-BORGES Y COLS., 2007). Para ello, se conecta una de las salidas de una unión tipo T a la bomba que genera el flujo, otra a la columna analítica y la última a un capilar vacío de longitud y d.i. adecuado. El grado de división del flujo puede variarse cambiando la longitud y d.i. correspondiente a este último capilar. Mediante este sistema es fácil conseguir nano/microflujos

para la elución en régimen isocrático, pero no son adecuados para la elución en gradiente debido a la contrapresión causada por las diferentes viscosidades de las mezclas de disolventes. No obstante, hoy en día se comercializan sistemas basados en *split-flow* que utilizan dispositivos de control de flujo electrónicos para mantenerlo constante mientras cambia la viscosidad de la fase móvil. Una de las principales desventajas de éstos es que requieren flujos iniciales elevados, y por tanto, el ahorro de disolvente no es tan importante.

En lo que respecta a las características de ambas técnicas, está claro que la sensibilidad de un analito aumenta con la disminución del d.i. de la columna, porque disminuye la dilución cromatográfica (VISSERS Y COLS., 1997). Sin embargo, no hay que perder de vista que el volumen de muestra inyectado debe ser bajo para evitar un ensanchamiento de pico. Los volúmenes de inyección usuales en nano-LC y CLC son del orden de 10-100 nL, valores con los que se obtienen límites de detección (LODs) considerablemente peores cuando se compara con los obtenidos mediante la HPLC convencional, donde se inyectan volúmenes de 5 a 20 μL . Para corregir esta evidente disminución de la sensibilidad, se hace uso, además de detectores sensibles y específicos (MS o UV con paso de luz extendido, entre otros), de técnicas de inyección de grandes volúmenes como la focalización en columna (VISSERS Y COLS., 1996) o incluso el empleo de micro-precolumnas en las que se realiza una preconcentración en línea (separación en 2D).

En la focalización en columna, se inyecta un volumen importante de muestra, disuelta en una mezcla de disolventes con capacidad de elución mucho más baja que la de la propia fase móvil. De este modo, los analitos se acumulan o preconcentran en la cabeza de la columna en una banda muy estrecha (*plug*) incluso utilizando volúmenes de inyección altos. Posteriormente, son eluidos mediante la fase móvil. Con esta técnica, se obtiene una mejora de la sensibilidad considerable, incluso del orden de 100 veces (CAPPIELLO Y COLS., 2002b) y no requiere el uso de un equipamiento especial.

Asimismo, conviene destacar el uso de sistemas en 2D donde la muestra es focalizada/preconcentrada en una micro-precolumna de d.i. mayor que la columna analítica, y con la que se pueden utilizar velocidades de flujo mayores (del orden de $\mu\text{L}/\text{min}$) (VISSERS Y COLS., 1997). Posteriormente, los analitos se transfieren a la columna analítica mediante la fase móvil. Para ello, es necesario

el uso de válvulas de inversión de flujo para controlar la introducción del volumen de inyección en la precolumna, el paso de fase móvil por la misma, y la posterior separación cromatográfica en la columna analítica. Por tanto, la instrumentación es algo más compleja que la que se utiliza en la focalización en columna.

Una detallada revisión bibliográfica deja claro que la proteómica es el campo en el que la nano-LC y la CLC han encontrado su mayor aplicación (ZHANG Y COLS., 2010a). El número de trabajos en los que se han desarrollado metodologías en otros campos es todavía muy limitado. La Tabla I.6 recoge los trabajos publicados hasta el momento en lo que concierne al análisis de plaguicidas en muestra medioambientales. En general, se han analizado distintas familias de plaguicidas en diferentes tipos de aguas, y sólo en un caso en suelos (ROSALES-CONRADO Y COLS., 2002b). En lo que respecta a estas aplicaciones, en la mayoría de los casos se ha llevado a cabo una preconcentración fuera de línea mediante extracción en fase sólida (SPE) con fases estacionarias convencionales como GCB no poroso (CAPPIELLO Y COLS., 2002), poli-divinilbencen-vinilpirrolidona (Oasis HLB) (FAMIGLINI Y COLS., 2005) y C₁₈ (FAMIGLINI Y COLS., 2008; ARMENTA Y LENDL, 2010) o microextracción en fase sólida (SPME) en el modo *in tube* (CHÁFER-PERICÁS Y COLS., 2006, 2007; MOLINER-MARTÍNEZ Y COLS., 2011). Sólo se ha utilizado la focalización en columna, como método de preconcentración en línea, en dos ocasiones (LEÓN-GONZÁLEZ Y COLS., 2001; ROSALES-CONRADO Y COLS., 2002).

I.2.3.- ELECTROFORESIS CAPILAR (CE)

En la actualidad, la electroforesis capilar (CE) es tal vez la técnica miniaturizada que puede considerarse más consolidada. La existencia del flujo electroosmótico (EOF) con su característico perfil plano, es el fenómeno en torno al cual giran las principales ventajas de la técnica: tiempos de análisis cortos, elevadas eficacias y buena resolución. Además, los bajos requerimientos de volumen de muestra (1-10 nL) así como de reactivos y disolventes, hacen que la CE se haya convertido en una técnica de separación de gran importancia, especialmente en el campo biomédico (GARCÍA-PÉREZ Y COLS., 2008), aunque en el campo medioambiental, en particular, en el análisis de plaguicidas, también se ha utilizado con éxito (MALIK Y FAUBEL, 2001; PICÓ Y COLS., 2003).

Tabla I.6.- Aplicaciones de la nano-LC y la CLC al análisis de plaguicidas en muestras de interés medioambiental.

| Plaguicidas | Muestra | Pretratamiento y preconcentración | Columna | Fase móvil | Detección | LODs | Referencia |
|--|---|--|--|--|--------------------------------|-------------------|--------------------------------|
| 8 Triazinas | Agua subterránea | IEC (aniónico), focalización en columna | C ₁₈ (15 cm x 300 µm; 3 µm) | ACN/agua/ acetato amónico (isocrático) | UV | 0,009-0,71 µg/L | LEÓN-GONZÁLEZ Y COLS., 2001 |
| 2 Clorofenoxiácidos y 3 de sus ésteres | Suelo | UAE (ACN), UAE (H ₂ SO ₄ diluido), focalización en columna | C ₁₈ (15 cm x 300 µm; 3 µm) | MeOH/ácido fosfórico (isocrático) | UV | 0,3-0,5 µg/g | ROSALES-CONRADO Y COLS., 2002 |
| 10 OPPs | Agua de río | SPE (GCB no poroso) | C ₁₈ (15 cm x 75 µm; 3 µm) | ACN/agua (isocrático) | Direct-EI-MS (Q) | 0,003 µg/L | CAPPIELLO Y COLS., 2002b |
| 8 de diferentes familias | Agua de mar | SPE (Oasis HLB) | C ₁₈ (15 cm x 75 µm; 3 µm) | ACN/agua (gradiente) | Direct-EI-MS (Q) | 0,0004-0,119 µg/L | FAMIGLINI Y COLS., 2005 |
| 5 Triazinas | Agua de río, subterránea, residual, de riego y de campo | <i>In tube</i> SPME | C ₁₈ (15 cm x 500 µm; 5 µm) | ACN/agua (isocrático) | UV | 0,025-0,5 µg/L | CHÁFER-PERICÁS Y COLS., 2006 |
| 9 OPPs | Agua de río, subterránea, residual, de riego y de campo | <i>In tube</i> SPME | C ₁₈ (15 cm x 500 µm; 5 µm) | ACN/agua (gradiente) | UV y FD | 0,1-10 µg/L | CHÁFER-PERICÁS Y COLS., 2007 |
| 12 OCPs | Agua Milli-Q, de mar y de río | SPE (C ₁₈) | C ₁₈ (15 cm x 75 µm; 3,5 µm) | ACN/agua (gradiente) | API-MS (Q) | 0,044-0,33 µg/L | FAMIGLINI Y COLS., 2008 |
| 4 de diferentes familias | Agua de río | SPE (C ₁₈) | C ₁₈ (15 cm x 300 µm; 3 µm) | MeOH/agua (gradiente) | UV, detección IR medio y Raman | 0,002 µg | ARMENTA Y LENDL, 2010 |
| 9 de diferentes familias | Agua de depuradora | <i>In tube</i> SPME | C ₁₈ monolítica (15 cm x 200 µm) | ACN/agua (isocrático) | UV | 0,005-0,05 µg/L | MOLINER-MARTÍNEZ Y COLS., 2011 |

ACN: acetonitrilo. API: ionización a presión atmosférica. Direct-EI: impacto electrónico directo. IEC: cromatografía de intercambio iónico. IR: infrarrojos. Q: cuadrupolo

La enorme versatilidad de la técnica deriva parcialmente de sus numerosos modos de separación. Éste es el caso de la CE en zona libre (CZE), la CE en medio no acuosos (NACE), la cromatografía electrocinética micelar (MEKC), la electrocromatografía capilar (CEC), la CE en gel (CGE), el isoelectroenfoque capilar (CIEF) y la isotacoforesis capilar (CITP), que ofrecen diferentes mecanismos de separación y selectividad.

La técnica, sin embargo, tiene un inconveniente importante que es su baja sensibilidad debido al corto paso de luz en los capilares (cuando se utilizan sistemas de detección en los que este parámetro es importante) y al pequeño volumen de muestra introducido (LANDERS, 2008; BURGI Y BRADEN, 2008). A pesar de ello, este problema ha sido resuelto en muchos casos gracias al empleo de técnicas de preconcentración, tanto en línea (KARTSOVA Y BESSONOVA, 2009; CHEN Y COLS., 2012) como fuera de línea (LANDERS, 2008).

En particular, las técnicas electroforéticas de preconcentración en línea, también denominadas en su mayoría técnicas de *stacking*, explotan las diferencias de fuerza iónica, pH y conductividad entre el medio de la muestra y el electrolito de separación (BGE) (SIMPSON JR. Y COLS., 2008; KARTSOVA Y BESSONOVA, 2009). En este sentido, existen diferentes técnicas de preconcentración en línea, de las cuales las más importantes son, probablemente, y dado su uso extendido, el *stacking* en modo normal (NSM), el *stacking* con eliminación de matriz o de largos volúmenes (SWMR o LVSS), la inyección con amplificación de campo (FESI o FASS), el *sweeping* y la isotacoforesis (ITP). Algunos ejemplos de la aplicación de estas técnicas al análisis de plaguicidas por CE pueden apreciarse en la Tabla I.7.

De todas ellas, la inyección electrocinética se ha utilizado frecuentemente desde su introducción en los años 1980s, debido a su simplicidad instrumental así como a su efectividad en lo que al aumento de la sensibilidad se refiere. Los analitos se introducen en el capilar tanto por migración como por la acción del EOF, por lo que una característica particular de esta forma de inyección, que repercute directamente sobre su éxito como tal, es que depende de la carga y de la movilidad electroforética de los solutos individuales. Esta última puede verse aumentada cuando la conductividad de la muestra es inferior a la del BGE, de forma que los analitos iónicos son introducidos selectivamente en el interior del

capilar. Por ello, es importante optimizar el voltaje y el tiempo de inyección, así como la composición del medio de la muestra. Cuando la conductividad de esta última es inferior a la del BGE, este fenómeno se denomina *stacking* por amplificación del campo (FASS o FESI) (CHIEN Y BURGI, 1991, 1992). De esta forma, aumenta la cantidad de analito inyectada, ya que se preconcentra en la interfase entre la muestra y el BGE, dando lugar a una inyección muy estrecha. En algunos casos, incluso se ha sugerido una inyección previa de un pequeño volumen de agua con objeto de aumentar el campo eléctrico en el punto de inyección, y de introducir una región libre de iones distante de la entrada del capilar para favorecer la preconcentración. Esto es especialmente importante cuando la matriz de la muestra posee una alta conductividad (QUIRINO Y TERABE, 2000).

Tabla I.7.- Ejemplos representativos de la aplicación de la CE con distintos detectores y técnicas de *stacking* para la determinación de plaguicidas en muestras de interés medioambiental.

| Plaguicidas | Muestra | Pretratamiento (<i>stacking</i>) | Modo y detección | Referencia |
|----------------------------|--|------------------------------------|----------------------|--------------------------------|
| 5 Fungicidas | Suelo | UAE, SPE (FESI) | CZE-UV | HERNÁNDEZ-BORGES Y COLS., 2005 |
| 3 Bipiridilos | Agua mineral y de suministro urbano | SPE (SWMR) | CZE-UV | NÚÑEZ Y COLS., 2002 |
| Metribuzín y 2 metabolitos | Suelo | UAE, SPE (-) | MEKC-UV | HUERTAS-PÉREZ, 2006 |
| 12 de diferentes familias | Agua mineral, de suministro urbano y de estanque | SPE (REPSM) | MEKC-UV | RAVELO-PÉREZ Y COLS., 2007 |
| 8 Atrazinas | Suelo | UAE, MISPE (NSM) | MEKC-UV | TURIEL Y COLS., 2001 |
| 12 Sulfonilureas | Agua de pantano | SPE-SPE (-) | CZE-UV CZE-ESI-MS | KRYNITSKY, 1997 |

ESI: ionización por electrospray. REPSM: *stacking* en modo de polaridad invertida, equivalente a SWMR cuando se utiliza un BGE que contiene micelas.

I.2.3.1.- ELECTROFORESIS CAPILAR EN MEDIO NO ACUOSOS (NACE)

El empleo de medios acuosos en CZE está limitado a la separación de compuestos polares, mientras que para compuestos no polares se requiere la adición de modificadores como tensioactivos o codisolventes orgánicos (SILVA, 2009). Es por ello que, uno de los modos de CE que ha suscitado especial atención

durante las últimas dos décadas es NACE (RIEKKOLA Y COLS., 2000; RIEKKOLA, 2002; LAURENT Y JEAN-LUC, 2009). El uso de sistemas agua/disolvente orgánico así como de medios no acuosos (NACE) ha ampliado el margen de aplicación de la CE, ya que es posible trabajar con medios de diferentes constantes dieléctricas, polaridades, viscosidades, propiedades ácido-base, etc.

Una de las características más atractivas de NACE es la amplia variedad de disolventes y mezclas de ellos que se pueden utilizar. Cuando se usan disolventes orgánicos en lugar de agua, la escala de pH se puede ver ligera o drásticamente afectada dependiendo del valor de la constante de autoprotólisis (pK_s) de los disolventes utilizados. Por otra parte, los valores de pK_a de los electrolitos que suelen adicionarse al BGE también se ven influenciados por la naturaleza del disolvente. Así, a modo de ejemplo, el pK_a del ácido acético varía de 4,8 en agua a 9,7 en MeOH y 22,3 en acetonitrilo (ACN) (PORRAS Y KENNDLER, 2004). Debido a que los disolventes orgánicos difieren unos de otros en su comportamiento autoprotolítico, la elección de un disolvente y de aditivos apropiados puede dar lugar a separaciones que, en ocasiones, no son posibles en sistemas acuosos (CARABIAS-MARTÍNEZ Y COLS., 1997; HUMAM Y COLS., 2005).

Posiblemente, más interesante es el hecho de que los valores de pK_a de los analitos se ven también fuertemente afectados (RIEKKOLA, 2002; PORRAS Y KENNDLER, 2004). El sustituir el agua por un disolvente orgánico eleva los pK_a de distinta forma según la naturaleza básica o ácida de los mismos, convirtiendo la selección del BGE en algo fundamental. Esto es útil para la separación de compuestos neutros. Normalmente, en disolución acuosa el analito posee un grupo sin carga entre pH 0 y 14 pudiendo llegar a protonarse en condiciones extremadamente ácidas. En agua, estos valores de pH tan bajos se pueden conseguir sólo con ácidos fuertes concentrados, dando lugar a conductividades muy elevadas difícilmente compatibles con los altos campos eléctricos aplicados en CE y a un EOF prácticamente inexistente. Sin embargo, como se ha comentado, al producirse un aumento de los valores de pK_a en MeOH y ACN, por ejemplo, en NACE se requieren condiciones ácidas menos extremas (LIU Y COLS., 2006; RODRÍGUEZ-GONZALO Y COLS., 2009) que posibilitan la protonación.

Por otra parte, la existencia de heteroconjugación (una especie no cargada dadora de hidrógenos, HR, y un anión pequeño, A⁻, pueden estar en equilibrio

con la especie RH⁺-A) es capaz de aumentar la selectividad de esta técnica. El ACN, por ejemplo, es un disolvente ideal para propiciar este fenómeno entre analitos neutros y los electrolitos del BGE, lo que se puede emplear para convertir especies no cargadas en especies con carga capaces de experimentar electromigración (RIEKKOLA, 2002).

Tradicionalmente, NACE ha sido muy utilizada para el análisis de fármacos (GEISER Y VEUTHEY, 2007, 2009), mientras que sólo un reducido número de trabajos ha mostrado su potencial para la determinación de plaguicidas. En algunas investigaciones publicadas se ha tenido como finalidad indagar de forma teórica en los efectos del medio no acuoso sobre otros parámetros de la separación, empleando algunos de ellos como compuestos modelo (CARABIAS-MARTÍNEZ Y COLS., 1997, 2006a; MENZINGER Y COLS., 2001). Sin embargo, sólo en muy pocos casos se ha completado el análisis de plaguicidas en muestras medioambientales. En este sentido, cabe destacar los trabajos desarrollados para la determinación de diversas familias de plaguicidas en aguas de distintos tipos (CARABIAS-MARTÍNEZ Y COLS., 1999, 2000, 2002, 2006b; XU Y COLS., 2010), así como OPPs en suelos (HUANG Y COLS., 2007). La Tabla I.8 resume estos trabajos.

Debido al problema de la baja sensibilidad asociada a la técnica, en muchos de estos trabajos de NACE se han empleado métodos de preconcentración, tanto fuera de línea, destacando el uso de la SPE (CARABIAS-MARTÍNEZ Y COLS., 2000, 2002, 2006b), como en línea, con el empleo frecuente de la inyección electrocinética (CARABIAS-MARTÍNEZ Y COLS., 1999, 2000, 2002, 2006b; XU Y COLS., 2010).

I.3.- NUEVAS TENDENCIAS EN LA PREPARACIÓN DE MUESTRA PARA EL ANÁLISIS DE PLAGUICIDAS

En el proceso analítico, la preparación de muestra constituye un paso crucial para el éxito del mismo. A pesar de que la instrumentación analítica ha sido altamente mejorada, sobre todo con el acoplamiento de las diferentes técnicas a espectrómetros de masas de gran sensibilidad y resolución, lo cierto es que las muestras complejas requieren una extracción lo más selectiva posible de los compuestos a determinar, conjuntamente con una purificación adecuada o limpieza del extracto.

Tabla I.8.- Aplicaciones de NACE al análisis de plaguicidas en muestras medioambientales.

| Plaguicidas | Matriz | Pretratamiento | BGE | Detección | LODs | Referencia |
|---|------------------------------------|-----------------------------------|---|-----------|----------------|----------------------------------|
| 6 Triazinas | Agua de suministro urbano y de río | CPE (Triton X-114) | ACN/MeOH (50:50 v/v), 20 mM SDS, 10 mM HClO ₄ | UV | - | CARABIAS-MARTÍNEZ Y COLS., 1999 |
| 6 Triazinas | Agua de río | SPE (Oasis HLB) | ACN/MeOH (50:50 v/v), 17 mM SDS, 7,5 mM HClO ₄ | UV | 0,01-0,05 µg/L | CARABIAS-MARTÍNEZ Y COLS., 2000 |
| 6 Triazinas | Agua de suministro urbano y de río | SPE (Oasis HLB) | ACN/MeOH (50:50 v/v), 17 mM SDS, 7,5 mM HClO ₄ | UV | 0,01-0,05 µg/L | CARABIAS-MARTÍNEZ Y COLS., 2002 |
| 8 Triazinas | Agua de consumo y de río | SPE (LiChrolut EN) | MeOH, 40 mM SDS, 7,5 mM HClO ₄ | UV | 0,01-0,32 µg/L | CARABIAS-MARTÍNEZ Y COLS., 2006b |
| Enantiómeros de 4 OPPs | Suelo | Extracción (MeOH y carbón activo) | MeOH/ACN (4:1 v/v), SDS o SC | UV | - | HUANG Y COLS., 2007 |
| Picloram, 2,4-DCBA, fenoprop, 2,4-D, diclorprop, 3,5-DCBA | Agua de río | HF-LPME (1-octanol) | MeOH, 25 mM acetato amónico, 1 M ácido acético | UV | 0,08-0,14 µg/L | XU Y COLS., 2010 |

- Datos no encontrados/No aplicable. CPE: extracción en punto de nube. HF-LPME: microextracción en fase líquida con fibra hueca. SC: colato sódico. SDS: dodecilsulfato sódico.

En lo referente a la determinación de plaguicidas, además de lo anterior, hay que tener en cuenta que la mayoría de las veces estos analitos están presentes en las muestras a niveles traza. En el caso de las aguas, la normativa europea vigente exige su determinación por debajo de los límites máximos de residuos (LMRs) establecidos (sección I.1.3.1), con lo que se hace necesaria una preconcentración considerable de los analitos. En cuanto a los suelos, es recomendable su determinación a concentraciones del orden de ng/g (ANDREU Y PICÓ, 2004), por lo que tampoco pueden ser analizados sin una conveniente preparación de la muestra.

Hoy en día, el tratamiento de la muestra constituye el paso limitante, en lo que a tiempo de análisis se refiere, de todo el proceso analítico. Sin embargo, es totalmente imprescindible y determina la calidad del resultado final del método. La Figura I.2 resume de forma esquemática las principales tendencias de hoy en día en el tratamiento de muestra, que se centran en la simplificación del mismo, su miniaturización, automatización y rapidez. Además, se prefiere la utilización de técnicas y procedimientos que eviten el uso indiscriminado de disolventes y reactivos altamente tóxicos, o que sean ecológicos, manteniendo una buena eficacia de extracción.



Figura I.2.- Principales tendencias en el desarrollo de técnicas para la preparación de muestra.

Adaptado de Tankiewicz y cols. (2011).

I.3.1.- NUEVOS MATERIALES Y DISOLVENTES

Una de las tendencias en auge dentro del tratamiento de muestra es el empleo de nuevos materiales y disolventes, que permitan el desarrollo de técnicas alternativas más selectivas, sencillas, seguras y menos contaminantes. La búsqueda de estas nuevas sustancias y, sobre todo, de su posible utilización en un amplio número de procesos, constituye una importante línea de investigación en Química Analítica.

Durante las últimas décadas han surgido materiales como los altamente selectivos MIPs (BELTRÁN Y COLS., 2010), los materiales de acceso restringido (RAM) (SADÍLEK Y COLS., 2007), los adsorbentes de inmunoafinidad (BOUZIGE Y PICHON, 1998) o los CNTs (TROJANOWICZ, 2006), así como los ILs como nuevos disolventes (LIU Y COLS., 2009a), aunque ha sido sobre todo durante los últimos años cuando han cobrado una especial importancia. Dado que a lo largo de esta Tesis Doctoral, se han utilizado tanto los CNTs como los ILs, a continuación se profundizará en sus características y aplicaciones generales en Química Analítica.

I.3.1.1.- NANOTUBOS DE CARBONO (CNTs)

Durante los últimos veinte años, los CNTs se han convertido en uno de los nuevos materiales más estudiados en muchos campos de la ciencia, debido a sus llamativas propiedades (YING Y COLS., 2011). Descubiertos formalmente por Iijima (IJIMA, 1991; IJIMA E ICHICHASHI, 1993) y Bethune y cols. (1993), hoy en día se pueden sintetizar de forma controlada y en grandes cantidades mediante descarga en arco eléctrico (JOURNET Y COLS., 1997), ablación laser (THESS Y COLS., 1996) o deposición de vapor químico (CVD) (FLAHAUT Y COLS., 2005), que son los métodos más empleados. A pesar de ello, su producción y purificación a gran escala de un modo económico y viable, tan necesarios actualmente, está todavía en vías de desarrollo (YING Y COLS., 2011).

Precisamente del método de síntesis van a depender muchas de las propiedades de los CNTs, ya que se pueden obtener abiertos o cerrados en sus extremos, de diferentes dimensiones (diámetro y longitud), torsión (*zig-zag*, silla o quiral) y con diferente número de paredes. De hecho, hoy en día, se dispone de un buen número de CNTs de distintas características distribuidos por diferentes casas comerciales.

La posibilidad de funcionalización química de estas moléculas puede cambiar o mejorar sus propiedades, lo que las dota de un potencial todavía mayor. En general, es posible modificarlos de forma covalente o no covalente (MENG Y COLS., 2009). En la primera de ellas, se suele llevar a cabo una etapa inicial de oxidación con un ácido fuerte (HNO_3 , H_2SO_4) a alta temperatura, lo que introduce grupos carboxílicos en la estructura del CNT que, mediante las correspondientes reacciones de sustitución, pueden anclar distintos grupos funcionales. Respecto a la funcionalización no covalente, los CNTs tienden a formar agregados con tensioactivos así como complejos supramoleculares con polímeros (HU Y COLS., 2009) mediante fuerzas de van der Waals, interacciones π - π , enlaces de hidrógeno o fuerzas electrostáticas, entre otras. Ambos tipos de funcionalización pueden ser además convenientemente aprovechados para aumentar la solubilidad de los mismos en diferentes disolventes, ya que ésta es bastante limitada.

Tanto los CNTs de pared sencilla (SWCNTs) como los de pared múltiple (MWCNTs) presentan propiedades físicas, químicas, térmicas y mecánicas singulares. De hecho, su elevada conductividad, su resistencia mecánica y su estabilidad química han propiciado su uso para diferentes aplicaciones tecnológicas tales como baterías, transductores electroquímicos y sensores (DELGADO Y COLS., 2007). Además, su utilización está siendo cada vez mayor en otros campos como la biomedicina, tanto en ingeniería biomédica y de tejidos como en tecnología de biosensores, neuroingeniería, terapia génica, etc.

Gracias a sus propiedades inherentes y a la posibilidad de funcionalización, los CNTs también han encontrado aplicación en el campo de la Química Analítica. Su excelente capacidad de adsorción, y su gran estabilidad térmica y química (los no funcionalizados son estables hasta 1200 °C), han sugerido su uso como fases estacionarias en GC (MERLI Y COLS., 2010; SAFAVI Y COLS., 2010; DUAN Y COLS., 2011). Esta excelente estabilidad previene el sangrado de la columna y permite trabajar a temperaturas más altas que con fases estacionarias convencionales. Normalmente se deposita una fina película de CNTs en la superficie de la columna cromatográfica por CVD (VALCÁRCEL Y COLS., 2008), consiguiendo sobre todo una mejora de la forma de los picos. Este campo ha sido poco explorado, aunque lo ha sido todavía menos el uso de estos

materiales como fases estacionarias en LC (DUAN Y COLS., 2011). En este último caso, los CNTs se han utilizado, en general, en combinación con un segundo material de empaquetamiento (MENA Y COLS., 2006) o incorporados a un polímero monolítico poroso (CHAMBERS Y COLS., 2011). En CE y CEC se han utilizado como fases pseudoestacionarias o estacionarias, respectivamente (DUAN Y COLS., 2011). A este respecto, su introducción en el capilar se ha llevado a cabo conjuntamente con tensioactivos, cuando se trata de una funcionalización no covalente (SUÁREZ Y COLS., 2007c), o bien simplemente como aditivos, una vez funcionalizados covalentemente (XU Y LI, 2006). Además, los CNTs también se han utilizado en MS de tiempo de vuelo (TOF), concretamente como matrices cuando se lleva a cabo una ionización/desorción láser asistida por matriz (MALDI-TOF) (SHRIVAS Y WU, 2010) o por superficie (SALDI-TOF) (LEE Y COLS., 2010). De forma análoga, se ha descrito su uso para la fabricación de membranas poliméricas para filtración (MOSTAFAVI Y COLS., 2009).

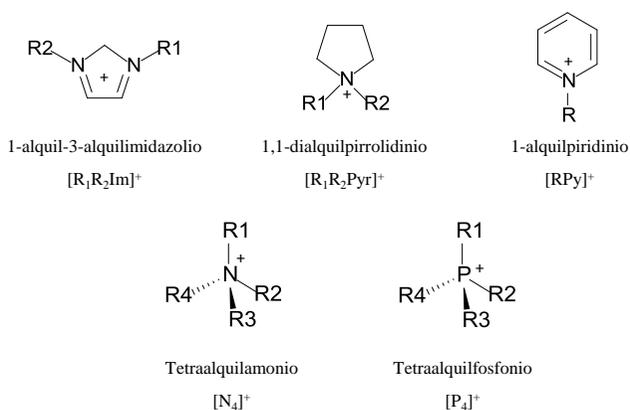
Posiblemente, el campo de aplicación más importante de los CNTs en Química Analítica responde a su uso como sorbentes, bien como fases estacionarias para SPE, o como recubrimientos de fibras en SPME (PYRZYNSKA, 2011). Su gran área superficial, el gran número de cavidades presentes en su estructura, especialmente en los MWCNTs, su gran capacidad para enlazar moléculas hidrofóbicas, habilidad para establecer interacciones electrostáticas π - π y capacidad de funcionalización los convierten en materiales ideales para este fin. En este sentido, además del uso de CNTs sin modificar y funcionalizados, es de destacar la reciente introducción de los CNTs magnéticos, obtenidos mediante su unión química o física a nanopartículas magnéticas como Fe_3O_4 o FeCl_3 (JIANG Y GAO, 2003; DENG Y COLS., 2005). Asimismo, recientemente se ha descrito su uso como soporte para MIPs (ZHANG Y COLS., 2010b), lo que supone un aumento de su selectividad como sorbentes.

I.3.1.2.- Líquidos iónicos (ILs)

Los ILs son sales que poseen un punto de fusión por debajo de 100 °C. Muchos de ellos son líquidos a temperatura ambiente, denominándolos entonces específicamente como ILs a temperatura ambiente (RTIL) (WELTON, 1999). El término IL comprende sales tanto orgánicas como inorgánicas, aunque la mayoría están formados por un catión orgánico voluminoso disimétrico que

contiene átomos de nitrógeno o fósforo (alquilimidazolio, alquilpiridinio, alquilpirrolidinio, tetraalquilamonio o tetraalquilfosfonio). Los contraiones pueden ser tanto inorgánicos, tipo cloruro, bromuro, ioduro, tetrafluoroborato o hexafluorofosfato, como orgánicos, tipo dicianimida, alquilsulfato, triflato, tosilato o bis(trifluorometilsulfonyl)amida (LIU Y COLS., 2009a; SUN Y ARMSTRONG, 2010). La Figura I.3 muestra los cationes y contraiones más comunes que componen los ILs.

Cationes comunes



Aniones comunes

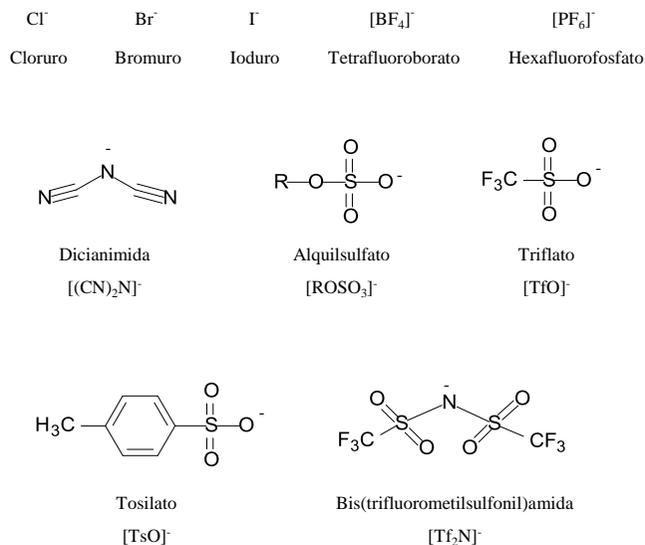


Figura I.3. Estructuras de los cationes y aniones de los ILs más comunes.

Los ILs poseen propiedades fisicoquímicas muy atractivas. Entre ellas cabe destacar el amplio rango de temperaturas en el que se encuentran en estado líquido, bajas presiones de vapor (de ahí su insignificante volatilidad), estabilidad electroquímica, buena conductividad eléctrica, amplia gama de viscosidades, reutilización, baja inflamabilidad, etc. (SUN Y ARMSTRONG, 2010). Estas propiedades dependen del tipo de anión y de catión que lo constituyan y dado que se estima la existencia de unos cien millones de ILs (CARMICHAEL Y SEDDON, 2000), las propiedades pueden variar de forma importante de unos a otros. Por esta razón y teniendo en cuenta la amplia variedad de ILs que se pueden sintetizar, se suelen denominar *disolventes de diseño*.

En el campo de la Química los ILs han encontrado importantes aplicaciones, sobre todo en síntesis orgánica, y más recientemente y a partir de finales de los años 1990s, también en Química Analítica. En este sentido y dentro de las técnicas de separación, han sido utilizados en GC (ARMSTRONG Y COLS., 1999) y en HPLC (LIU Y COLS., 2004) como fases estacionarias o como aditivos de la fase móvil en LC (POOLE Y COLS., 1986). Su uso en CE se ha centrado en la modificación de la pared del capilar para invertir el EOF (QIN Y LI, 2002) y como BGEs tanto en NACE (VAHER Y COLS., 2000) como en MEKC junto con tensioactivos poliméricos (MWONGELA Y COLS., 2003). En este último caso, también se han utilizado como tensioactivos catiónicos ya que ciertos ILs, concretamente los de cadenas alquílicas largas, son capaces de formar micelas en medios acuosos (BORISSOVA Y COLS., 2008). En algunos trabajos se ha descrito también la adición de ILs quirales al BGE con objeto de mejorar la enantioselectividad de las ciclodextrinas en las separaciones quirales (FRANCOIS Y COLS., 2007).

Por otra parte, en MS se han utilizado como matrices en MALDI (ARMSTRONG Y COLS., 2001; SUN Y ARMSTRONG, 2010) dada su baja volatilidad y alta capacidad de solubilizar diversos compuestos, así como aditivos para la detección de aniones pequeños en MS con ionización por electrospray (ESI) (MARTINELANGO Y COLS., 2005). Para ello, se emplea un IL dicatiónico o tricatiónico para formar complejos mono o dicargados positivamente que puedan ser detectados en modo positivo. También es destacable su uso en electroquímica como parte importante de sensores (BUZZEO Y COLS., 2004) y en espectroscopía (ARMSTRONG Y COLS., 1999).

Uno de los mayores campos de aplicación de los RTILs en Química

Analítica lo han encontrado en el ámbito de la preparación de muestra como disolventes en distintas técnicas de extracción (LIU Y COLS., 2009a). De hecho, se han utilizado en extracción líquido-líquido (LLE) (ARCE Y COLS., 2008), en microextracción en fase líquida (LPME) (REZAAE Y COLS., 2010), y como recubrimiento de las fibras de SPME (AGUILERA-HERRADOR Y COLS., 2010). Es importante destacar también, que el uso de la detección por MS cuando los analitos se encuentran disueltos en un IL tras una etapa de extracción, se ha visto restringido debido a la gran tendencia que tienen éstos a formar aductos que impedirían la correcta detección de los compuestos de interés.

En general, los ILs son relativamente impuros, lo que dificulta en ciertos casos su aplicación directa en la preparación de muestra (LIU Y COLS., 2009a). Muchas rutas sintéticas culminan con la obtención de ILs ligeramente coloreados con tonos amarillos o incluso marrones (EARLE Y COLS., 2007). Estas impurezas, a pesar de estar presentes por debajo de los LODs de la espectroscopía de resonancia magnética nuclear (NMR), muestran una gran absorción en la región del UV-Vis, así como cierta emisión en fluorescencia, que pueden o no interactuar con las medidas cromatográficas. Afortunadamente, en algunos casos estas interferencias no impiden la determinación de los analitos de interés y, por otra parte, se está avanzando en los procedimientos de purificación, que son cada vez más específicos y selectivos. Es preciso destacar que, en general, el propio IL absorbe en la región del UV-Vis (ANIRUDDHA Y COLS., 2004), lo que podría también interferir en la determinación cromatográfica si es inyectado en grandes cantidades. Por el contrario y, también de forma general, son mucho menos fluorescentes (ANIRUDDHA Y COLS., 2004), de ahí que este tipo de detección sea ventajosa en este sentido.

El incremento del número de trabajos publicados en los últimos años en el área de la Química Analítica en los que se utilizan los ILs, es un importante indicativo del gran potencial que poseen y del interés que despiertan. Sin embargo, aún no se conoce exactamente el porqué de algunas de sus propiedades (SUN Y ARMSTRONG, 2010). Por otra parte, su toxicidad y estabilidad a largo tiempo varían mucho de unos a otros, propiedades a tener en cuenta cuando se selecciona un IL para una determinada aplicación. Es de esperar que el uso de estos nuevos disolventes continúe expandiéndose, lo que, evidentemente,

resultará en una mejora de las técnicas, al mismo tiempo que incrementará el conocimiento sobre ellos y sus propiedades.

I.3.2.- TÉCNICAS MODERNAS EN LA PREPARACIÓN DE MUESTRA

Las técnicas modernas de pretratamiento de muestra están enfocadas a la miniaturización y simplificación de los montajes operacionales, así como al desarrollo de procedimientos más simples y económicos y al empleo de nuevos materiales y disolventes que se utilicen en menor cantidad y sean menos contaminantes. A continuación se describirán algunos de estos procedimientos que también han sido utilizados en la presente Tesis Doctoral.

I.3.2.1.- EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA DISPERSIVA (dSPE) Y MÉTODO QuEChERS

Hoy en día, la SPE es, sin duda alguna, el método de separación más utilizado. En las dos últimas décadas ha experimentado importantes mejoras sobre todo debido a la introducción de nuevos sorbentes (HENNION, 1999), tales como MIPs, inmunoabsorbentes, CNTs, etc. A ello hay que añadir los avances producidos en lo que a su formato y automatización se refiere.

Una de las modificaciones de formato que ha despertado cierto interés, ha sido la introducción de la SPE dispersiva (dSPE). En este caso, la extracción no se lleva a cabo en columnas, cartuchos o discos como en la SPE clásica, sino en el seno de la propia disolución. La fase estacionaria se añade directamente a la muestra líquida que contiene los analitos y, pasado un cierto tiempo que debe ser perfectamente controlado, se separa la fase estacionaria y se procede a la correspondiente elución de los compuestos. Como se puede deducir, su ejecución operacional es más fácil, más rápida y menos tediosa que la de la SPE clásica, en la que el paso de la muestra a través del cartucho, disco, etc., puede requerir tiempos extremadamente largos. No obstante, en la mayoría de los trabajos en los que se ha utilizado la dSPE, ésta se ha empleado como etapa de limpieza o *clean-up* de diferentes extractos (WILKOWSKA Y BIZIUK, 2011). Es decir, la fase estacionaria se utiliza para eliminar interferencias potenciales que puedan afectar en la posterior determinación cromatográfica o electroforética, añadiéndola al disolvente orgánico que se ha utilizado para la extracción de los analitos de la muestra. De todo esto se puede deducir que la elección del disolvente de extracción, así como de la fase estacionaria es decisiva, ya que en

este último caso es contraproducente que exista una retención de los analitos.

En este sentido, la mayoría de trabajos que emplean la dSPE como etapa de limpieza en la determinación de plaguicidas, se corresponden con la utilización del método QuEChERS. Desde su introducción en el año 2003 (ANASTASSIADES Y COLS., 2003), este método, denominado así por las palabras inglesas *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged y Safe*, ha alcanzado una gran popularidad por su gran rapidez y simplicidad en el tratamiento de muestra. En su versión original, desarrollada para la determinación de plaguicidas en frutas y verduras (ANASTASSIADES Y COLS., 2003; WILKOWSKA Y BIZIUK, 2011), el método consistió en una etapa inicial de extracción/partición de 10 g de muestra sólida triturada y homogeneizada con 10 mL de ACN, 1 g de NaCl y 4 g de MgSO₄ anhidro. A continuación, se realizó una etapa de limpieza del sobrenadante mediante dSPE con amina primaria/secundaria (PSA) y MgSO₄ anhidro.

Con el tiempo, el método ha sufrido modificaciones que han mejorado su robustez, a la vez que han permitido su aplicación a otro tipo de matrices e incluso de analitos. La modificación más común ha consistido en la adición de un tampón de citratos en la primera etapa del método para mantener el pH controlado entre 5,0 y 5,5 (ANASTASSIADES Y COLS., 2007), de un tampón acético/acetato o incluso de ácido fórmico. En todos estos casos se trata de evitar la degradación de plaguicidas fácilmente hidrolizables en medio básico (LEHOTAY Y COLS., 2005a). Además, el método es suficientemente consistente y flexible como para estudiar la adición de otros sorbentes en la dSPE con objeto de mejorar más aún si cabe la eliminación de compuestos interferentes (LEHOTAY Y COLS., 2010). Además de PSA (LEANDRO Y COLS., 2007; DONG Y COLS., 2009), se ha utilizado GCB para eliminar la clorofila de verduras que la contengan en cantidades importantes (CUNHA Y COLS., 2007; WALORCZYK, 2008) y alúmina (KOESUKWIWAT Y COLS., 2008), C₁₈-sílice (WALORCZYK, 2007; RAWN Y COLS., 2010) o incluso aminopropil-sílice (SCHENCK Y COLS., 2008) para eliminar grasas, proteínas y otros pigmentos provenientes de la matriz de la muestra. Por otra parte, cuando el contenido acuoso de la matriz es bajo, se suele añadir inicialmente una cantidad de agua determinada con objeto de debilitar las interacciones analito-matriz y favorecer así la extracción de los plaguicidas (MAŠTOVSKÁ Y COLS., 2010).

Tabla I.9.- Aplicaciones del método QuEChERS al análisis de plaguicidas en suelo.

| Plaguicidas | Cantidad de suelo | Extracción/partición | Volumen de sobrenadante | dSPE | Técnica de separación | R (%) | LODs | Referencia |
|---|-------------------|---|-------------------------|--|-----------------------|--------|--------------|------------------------------|
| 24 de diferentes familias | 10 g | 20 mL ACN, 4 g MgSO ₄ anhidro, 1 g NaCl, 1 g citrato trisódico dihidratado, 0,5 g hidrogenocitrato disódico sesquihidratado | Del paso anterior | 150 mg PSA 950 mg MgSO ₄ anhidro | HPLC-MS GC-MS | 27-121 | 0,02-88 ng/g | LESUEUR Y COLS., 2008 |
| Metaflumizona | 10 g | 5 mL agua, 10 mL ACN, 4 g MgSO ₄ anhidro, 1 g NaCl | 1 mL | 30 mg PSA 200 mg MgSO ₄ anhidro | HPLC-MS | 78-85 | 1 ng/g | DONG Y COLS., 2009 |
| Azadiractin, rotenona, espinosina A, espinosina D | 5 g | 25 mL agua, 10 mL ACN, 4 g MgSO ₄ anhidro, 1 g NaCl, 1 g citrato trisódico dihidratado, 0,5 g hidrogenocitrato disódico sesquihidratado | 5 mL | 150 mg PSA 900 mg MgSO ₄ anhidro | UHPLC-MS | 83-104 | 1,8-2,7 ng/g | DROŹDŹYŃSKI Y KOWALSKA, 2009 |
| Procimidona | 10 g | 3 mL agua, 10 mL ACN, 2 g NaCl | 1 mL | 50 mg PSA 250 mg MgSO ₄ anhidro | GC-MS | 83-93 | 1,65 ng/g | CHEN Y COLS., 2009 |

R: Recuperaciones

Como ampliación de la aplicabilidad del método, en el campo medioambiental ha sido utilizado para el análisis de plaguicidas en suelos en muy pocas ocasiones. La Tabla I.9 muestra los estudios al respecto desde 2008, año en el que fue publicado el primero de estos trabajos.

I.3.2.2.-MICROEXTRACCIÓN EN FASE LÍQUIDA (LPME)

Durante los últimos años, se han introducido con éxito nuevos procedimientos de extracción miniaturizados, la mayoría de los cuales se pueden agrupar en las que han sido denominadas como técnicas de LPME, que surgieron a partir de la LLE clásica (PSILLAKIS Y KALOGERAKIS, 2003).

En estos casos, la extracción tiene lugar entre algunos microlitros de un disolvente orgánico inmiscible en agua (denominado fase extractora o aceptora) y la fase acuosa (generalmente la muestra o fase dadora) que contiene los analitos de interés. En general, las técnicas de LPME combinan extracción y preconcentración en un solo paso con un bajo consumo de disolventes y de tiempo.

Estas técnicas se pueden clasificar en tres grandes categorías: microextracción en gota (SDME), microextracción en fase líquida con fibra hueca (HF-LPME) y microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME). A partir de los trabajos introductorios de cada técnica, se han llevado a cabo diversas modificaciones que se describirán a continuación, lo que demuestra su gran versatilidad y el estado actual de desarrollo de la técnica.

I.3.2.2.1.- MICROEXTRACCIÓN EN GOTA (SDME)

La SDME fue introducida por Jeannot y Cantwell en 1996 (JEANNOT Y CANTWELL, 1996). En ella la extracción tiene lugar en una microgota de disolvente (normalmente tolueno, hexano, ciclohexano, xileno o incluso ILs) que se forma en la aguja de una jeringa. Esta gota se introduce en la muestra acuosa que contiene los analitos de interés, de forma que son extraídos por el disolvente. Tras finalizar la extracción, la gota es retraída e inyectada en el sistema cromatográfico o electroforético.

Dentro de la SDME en dos fases, se puede distinguir la SDME de

inmersión directa (DI-SDME), en gota flotante (DSDME), gota a gota (DDME) y en flujo continuo (CFME); mientras que en tres fases se ha descrito tanto la SDME líquido-líquido-líquido (LLLME) como la SDME en espacio en cabeza (HS-SDME). Cuando el procedimiento tiene lugar en dos fases, los analitos son extraídos de la muestra acuosa -fase dadora- al disolvente orgánico -fase aceptora-. Por el contrario, en tres fases, los analitos primero son transferidos a otro disolvente orgánico (LLLME) o al espacio en cabeza (HS-SDME) y, posteriormente, pasan a la gota. La Figura I.4 muestra un esquema de los diferentes modos operacionales de la SDME descritos hasta la fecha.

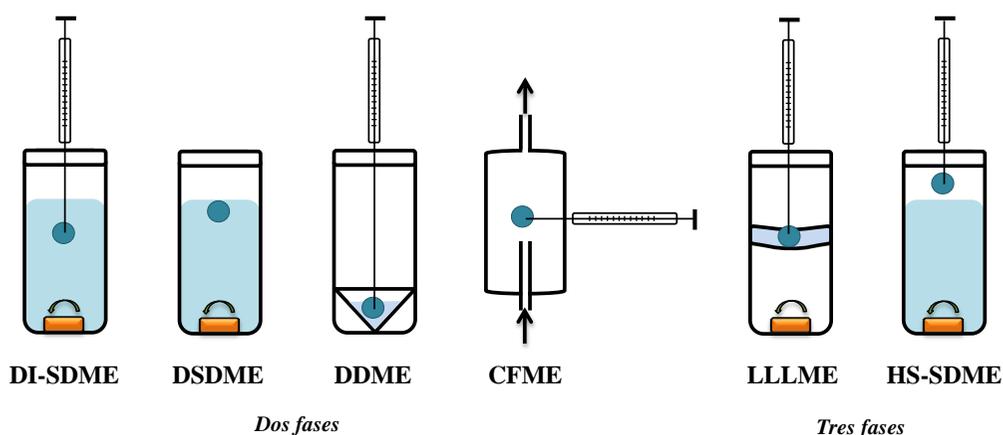


Figura I.4.- Modos operacionales de la SDME.

La SDME ha adquirido gran popularidad por la misma razón que el resto de las técnicas microextractivas: su bajo coste, sencillez, rapidez, bajo impacto medioambiental y compatibilidad con los sistemas de inyección de GC y HPLC (PAKADE Y TEWARY, 2010). Sin embargo, su uso plantea un grave inconveniente, que es la variación del volumen de la gota durante la extracción, especialmente cuando las condiciones son extremas: agitación intensa, tiempos de extracción largos y altas temperaturas. Esto afecta a la estabilidad de la gota y a la precisión analítica, a pesar de que se ha descrito incluso el uso de un estándar interno (IS) en la gota para corregirla (ROMERO Y COLS., 2007).

I.3.2.2.2.- MICROEXTRACCIÓN EN FASE LÍQUIDA CON FIBRA HUECA (HF-LPME)

Para solventar el problema de la inestabilidad de la gota en SDME, en 1999 se introdujo la HF-LPME (PEDERSEN-BJERGAARD Y RASMUSSEN, 1999) como una

técnica de LPME en la que los analitos se extraen inicialmente en lo que se conoce como una membrana líquida soportada (SLM) en los poros de una fibra hueca (HF) hidrofóbica, fabricada generalmente de polipropileno (PP). Posteriormente, los analitos se transfieren hacia una disolución aceptora localizada en su interior. Al igual que en la SDME, los modos de la HF-LPME pueden clasificarse según el número de fases implicadas (Figura I.5), de forma que existe tanto la HF-LPME en dos fases, HF(2)-LPME, como en tres fases, HF(3)-LPME (PEDERSEN-BJERGAARD Y RASMUSSEN, 2008). En ambos casos, la SLM se forma en los poros de la pared de la fibra, que se puede colocar en forma recta o en U, sumergiéndola o impregnándola en un disolvente orgánico inmiscible con el agua (normalmente *n*-octanol, dihexiléter, tolueno, etc.), previamente a su introducción en la muestra. En la HF(2)-LPME, el disolvente que impregna los poros es el mismo que posteriormente se introduce en el interior de la fibra (fase aceptora). Por el contrario, la HF(3)-LPME se lleva a cabo introduciendo una tercera fase acuosa aceptora en el interior, dando lugar a una microextracción líquido-líquido-líquido (LLLME). La Figura I.5 muestra los modos operacionales descritos para la técnica.

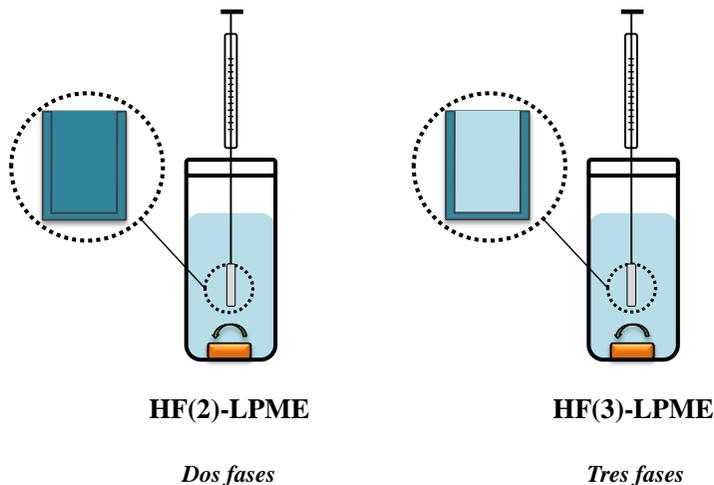


Figura I.5.- Modos operacionales de la HF-LPME.

Como se puede deducir, el *modus operandi* en tres fases es más complejo que en dos fases. Además, debido a la solubilidad entre la fase dadora contenida en el vial y la fase aceptora en el interior de la fibra, ésta debe sellarse en su extremo inferior. En la bibliografía se ha descrito el sellado con calor (MIRZAEI Y

DINPANAH, 2011) o incluso la unión del extremo libre de la fibra a la aguja de otra jeringa (BEDENDO Y COLS., 2010).

También en el caso de la HF(3)-LPME se ha descrito la adición de un disolvente portador (*carrier*) a la muestra (HO Y COLS., 2003) o a la SLM (YUDTHAVORASIT Y COLS., 2011) para mejorar la extracción de analitos hidrófilos que poseen K_{ow} menores de 1. En este caso, el *carrier* forma complejos neutros hidrofóbicos con los analitos por formación de pares iónicos. Éstos, una vez extraídos a la SLM, son transportados a la fase aceptora, generalmente motivado por un gradiente de pH.

Por otra parte, la HF-LPME se puede llevar a cabo en modo dinámico o estático, siendo el modo estático el más utilizado hasta el momento (LEE Y COLS., 2008). El término estático se utiliza cuando la fase aceptora se introduce en el hueco de la fibra y ésta, unida a la aguja de una jeringa, es introducida en la fase dadora. En cambio, en el modo dinámico la fase aceptora se introduce mediante una jeringa conectada a una bomba programable que inyecta disolvente en su interior de forma periódica, proporcionando siempre nueva fase aceptora (SARAFRAZ-YAZDI Y AMIRI, 2010).

La HF-LPME también ha experimentado algunas modificaciones respecto a su descripción original. Una de las variaciones desarrolladas cuando se lleva a cabo en dos fases es la llamada extracción líquido-líquido con membrana microporosa (MMLLE), en la que el disolvente orgánico contenido en la SLM extrae los analitos de una muestra acuosa, y luego la fibra se introduce en un vial que contiene otro disolvente en el que tiene lugar la desorción (PLAZA BOLANOS Y COLS., 2008). Otra variación, esta vez en tres fases, es la denominada microextracción líquido-líquido (LLME), con una SPE en membrana microporosa (MMSPE). En este caso, la fibra, que contiene en su interior la fase acuosa aceptora, es introducida directamente en la muestra acuosa sin haber sido previamente impregnada en el disolvente orgánico. Sin embargo, en este caso, el disolvente orgánico es añadido directamente a la muestra, de forma que a medida que se produce la agitación, las gotas de disolvente llegan a la fibra que se va impregnando en él (MMSPE) (BEDENDO Y COLS., 2010). Esto provoca la formación de una fina película de disolvente orgánico en la interfase entre la fase dadora y la membrana (LLME). La agitación, además, da lugar a la

formación de microgotas que aumentan el área de contacto entre el disolvente de extracción y la muestra, y renuevan continuamente la SLM. Esta modificación también ha recibido el nombre de membrana líquida renovada con fibra hueca (HF-RLM) (CARLETTO Y COLS., 2009; BEDENDO Y COLS., 2010; REN Y COLS., 2010).

En general, la HF-LPME requiere un sistema algo más sofisticado que el utilizado para la SDME. Sin embargo, una vez que el operador tiene experiencia en la técnica, ésta es altamente repetible y cómoda, sobre todo cuando se trabaja en el modo de dos fases.

I.3.2.2.3.- MICROEXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA (DLLME)

La DLLME fue introducida por primera vez en el año 2006 (REZAEI Y COLS., 2006) como una nueva técnica de LPME. Fue concebida originalmente como un sistema ternario de disolventes formado por una muestra acuosa que contiene los analitos, un disolvente de extracción insoluble en agua y un disolvente dispersor soluble en agua. La mezcla de los disolventes de extracción y dispersión se inyecta rápidamente en la muestra acuosa, de forma que el equilibrio se alcanza de inmediato dada la gran superficie de contacto entre las pequeñas gotas de disolvente extractor y la muestra acuosa. Después de centrifugar, el disolvente de extracción se puede recoger normalmente en el fondo del tubo (si tiene una densidad superior a la del agua) e inyectarlo en el sistema cromatográfico o electroforético correspondiente (REZAEI Y COLS., 2010). Es incluso posible efectuar un cambio de disolvente tras la evaporación del mismo. Los disolventes de extracción más utilizados suelen ser clorados como clorobenceno, diclorometano (DCM), tetracloruro de carbono, tetracloroetano, etc., aunque en los últimos años el uso de ILs ha cobrado importancia (REZAEI Y COLS., 2010). Los disolventes de dispersión más utilizados son, sin embargo, acetona, ACN, MeOH y etanol.

Desde su introducción, al igual que ocurrió con las otras técnicas, también se han descrito diversas modificaciones. En algunos casos, se han utilizado disolventes con una densidad inferior a la del agua, como alcoholes de cadena larga (1-octanol, 1-decanol, 1-undecanol, 1-dodecanol, 2-decanol, etc.), de modo que tras la centrifugación lo que se recoge es realmente una “gota flotante” (FO-DLLME) (MOINFAR Y HOSSEINI, 2009). Además, si la disolución se enfría

suficientemente y el disolvente tiene un punto de fusión bajo, se puede obtener una “gota flotante sólida” (SFO-DLLME), que puede ser fácilmente recolectada (ZHOU Y COLS., 2011) (Figura I.6). Tras un aumento de la temperatura, ésta puede ser inyectada en el correspondiente sistema de separación sin problema alguno.

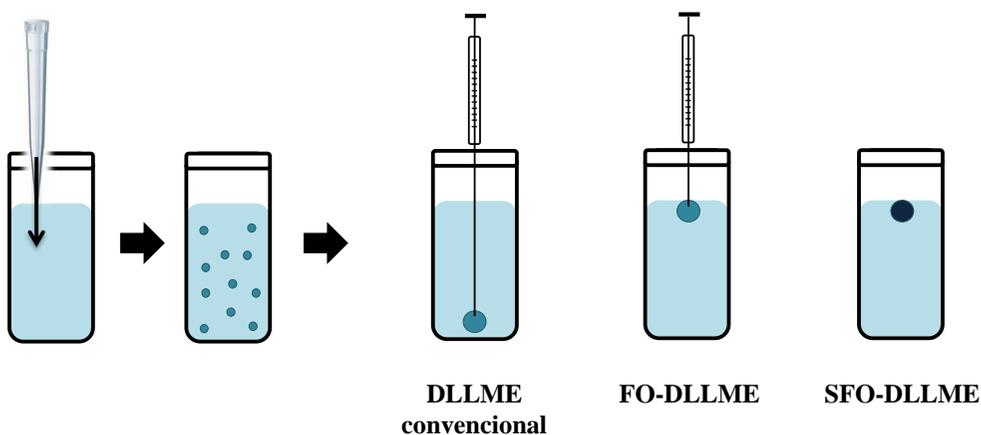


Figura I.6.- Esquema general del procedimiento de DLLME.

Por otra parte, también se ha descrito la ausencia de disolvente de dispersión, ya que éste normalmente disminuye los coeficientes de partición del analito en el disolvente de extracción. En estos casos se han utilizado ultrasonidos (JIA Y COLS., 2010) o incluso microondas (GAO Y COLS., 2010) para formar una emulsión y dispersar así el disolvente de extracción en la fase acuosa. También en ausencia de disolvente de dispersión, se ha utilizado la denominada DLLME a temperatura controlada. En ésta, el disolvente de extracción, que no es soluble a temperatura ambiente en la fase dadora, se añade a la muestra acuosa y se calienta hasta su total disolución. Posteriormente, tras enfriar y centrifugar, se puede recoger la gota de disolvente en el fondo del tubo. Hasta el momento, esta modalidad sólo ha sido utilizada con ILs como disolventes de extracción (BAI Y COLS., 2009).

La DLLME es, seguramente, la variante de LPME más utilizada en la actualidad, debido a la facilidad y rapidez de operación, así como a la estabilidad del sistema. Ha ido adquiriendo importancia a lo largo de los últimos años a una velocidad superior a la de la SDME y la HF-LPME.

En lo que respecta a la determinación de plaguicidas, las tres técnicas han sido utilizadas para su extracción de muestras biológicas, medioambientales y agroalimentarias (LAMBROPOULOU Y ALBANIS, 2007). Sin embargo, dentro de estas aplicaciones, su mayor campo lo han encontrado en el análisis de aguas (PINTO Y COLS., 2010), debido a la sencillez de la matriz y a los grandes factores de enriquecimiento que se pueden obtener con estas técnicas. En cuanto a la determinación de estos analitos en suelos, las Tablas I.10 y I.11 recopilan los trabajos publicados al respecto. Como se puede observar, la DLLME ha sido también en este campo la más utilizada, seguida de la HF-LPME y, con tan solo una aplicación, de la SDME.

Es de destacar que hasta el momento en el que se desarrolló la presente Tesis Doctoral, en ningún trabajo de la bibliografía en el que se utilizara la DLLME se habían utilizado ILs como disolventes de extracción para la determinación de plaguicidas en suelos. Además, en ningún caso y con ninguna de las técnicas de LPME se había llevado a cabo la determinación simultánea de plaguicidas y metabolitos.

Tabla I.10.- Aplicaciones de la HF-LPME y de la SDME al análisis de plaguicidas en suelos.

| Plaguicidas | Pretratamiento | Tipo de fibra y longitud | Fase dadora | Fase aceptora | Modo y condiciones de la LPME | Método de separación | LODs | Referencia |
|--------------------------|---|--|-------------------------------|---------------------------------|--------------------------------------|----------------------|----------------|------------------------------|
| 7 de diferentes familias | Lodo (40 mg suelo/mL de agua) | Accurel Q3/2 (600 x 200 x 0,2 µm) 1,3 cm | 4 mL agua | Tolueno (3 µL) | HF(2)-LPME dinámica 1000 rpm, 3 min | GC-MS | - | HOU Y COLS., 2003 |
| 8 de diferentes familias | Lodo (1 g suelo/ 4 mL de acetona/agua 40:60 v/v), US (5 min, 105 rad/s, 40 min) | Accurel Q3/2 (600 x 200 x 0,2 µm) 1,3 cm | 4 mL acetona/agua (40:60 v/v) | Tolueno (3 µL) | HF(2)-LPME dinámica 200 rpm, 4 min | GC-MS | 50-100 ng/g | HOU Y COLS., 2004 |
| Vinclozín | UAE (10 mL de ACN/MeOH 2:1 v/v), evaporación, reconstitución en agua | Accurel Q3/2 (600 x 200 x 0,2 µm) 1,3 cm | 5 mL agua | Tolueno (3 µL) | HF(2)-LPME estática 800 rpm, 20 min | GC-ECD | 0,5 ng/g | LAMBROPOULOU Y ALBANIS, 2004 |
| 12 OCPs | MAE (8 mL de agua) | Accurel Q3/2 (600 x 200 x 0,2 µm) 1,3 cm | 10 mL agua | Tolueno (5 µL) | HF(2)-LPME estática 700 rpm, 30 min | GC-MS | 0,1-0,7 ng/g | BASHEER Y COLS., 2005 |
| 6 OSPs | UAE (10 mL de agua, 40 min) | Accurel Q3/2 (600 x 200 x 0,2 µm) 1,0 cm | 5 mL agua | O-xileno (5 µL) | HF(2)-LPME estática 1200 rpm, 35 min | GC-FPD | - | XIONG Y HU, 2008 |
| 5 OCPs | 2 g de suelo sin tratar | - | 2 g suelo y 1 mL agua | [BMIm][PF ₆] (1 µL) | HS-SDME 40 min, 65 °C | GC-ECD | 0,25-0,50 ng/g | ZHANG Y LEE, 2010 |

- Datos no encontrados/No aplicable. Accurel Q3/2: fibra hueca de PP comercial. MAE: extracción asistida por microondas. UAE: extracción asistida por ultrasonidos.

US: ultrasonidos.

Tabla I.11.- Aplicaciones de la DLLME al análisis de plaguicidas en suelos.

| Plaguicidas | Pretratamiento | Disolvente de extracción | Disolvente dispersor | Fase acuosa | Método de separación | LODs | Referencia |
|---------------------------|---|---------------------------------|--|----------------------------|-----------------------------|----------------|-------------------|
| 6 OPPs | Extracción de 0,5 g de suelo con 10 mL de agua, ultrasonidos, filtración, dilución 25 veces | Tetracloruro de carbono (10 µL) | MeOH (0,8 mL) | 5 mL | GC-FPD | 0,21-3,05 µg/L | XIONG Y HU, 2008 |
| Carbendazima, tiabendazol | Extracción de 20 g de suelo con 40 mL de HCl 0,1M, agitación, filtración | Cloroformo (80 µL) | THF (0,75 mL) | 5 mL, pH 7, 10% (p/v) NaCl | HPLC-FD | 1,0-1,6 ng/g | WU Y COLS., 2009a |
| 4 Sulfonilureas | Extracción de 10 g de suelo con 20 mL de acetona/0,15M NaHCO ₃ (2:8 v/v), agitación, filtración, dSPE (C ₁₈) | Clorobenceno (60 µL) | Acetona (proveniente de la extracción) | 5 mL, pH 2 | HPLC-DAD | 0,5-1,2 ng/g | WU Y COLS., 2009b |

| | | | | | | | |
|---------------|---|---------------------------------|---|------------------|----------|----------------|----------------------|
| 6 OPPs | SFE (CO ₂) de 1,2 g de suelo, recolección con ACN | Tetracloruro de carbono (17 µL) | ACN (1 mL) (proveniente de la extracción) | 5 mL | GC-FID | 1-9 ng/g | NAEENI Y COLS., 2011 |
| 5 Triazinas | Extracción de 20 g de suelo con 20 mL de agua/MeOH (99:1 v/v), ultrasonidos, filtración | Cloroformo (100 µL) | ACN (1 mL) | 5 mL, 0,5 g NaCl | HPLC-DAD | 0,1-0,2 ng/g | WANG Y COLS., 2011 |
| 3 Piretroides | MSPD (sílice) de 0,1 g de suelo, elución con acetona, evaporación | Tetracloroetileno (50 µL) | Acetona (0,5 mL) (proveniente de la extracción) | 5 mL, pH 6,3 | GC-ECD | 0,45-1,13 ng/g | WANG Y COLS., 2012 |
| 3 OPPs | Extracción de 1 g de suelo con 5 mL de ACN, agitación, filtración | Clorobenceno (20 µL) | ACN (1 mL) (proveniente de la extracción) | 5 mL | GC-FPD | 2-5 ng/g | YANG Y COLS., 2012 |

MSPD: dispersión sólida en la matriz. THF: tetrahidrofurano

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

II.- OBJETIVOS

La presente Tesis Doctoral se llevó a cabo con el objetivo principal de desarrollar metodologías analíticas novedosas, rápidas, selectivas y con un bajo consumo de disolventes orgánicos para la determinación de plaguicidas y algunos de sus metabolitos en matrices de interés medioambiental como son las aguas y los suelos. Dentro de este objetivo principal existieron otros específicos que se detallan a continuación:

- Utilizar diferentes técnicas de separación, como la CE, la GC, la HPLC y la nano-LC con diferentes sistemas de detección, para obtener una adecuada resolución de diferentes grupos de plaguicidas y algunos de sus metabolitos.
- Emplear métodos de preconcentración en línea en CE y nano-LC, con el objetivo de incrementar la sensibilidad de ambas técnicas.
- Aplicar diferentes métodos de extracción y preconcentración fuera de línea para el análisis de suelos, tales como la UAE, el método QuEChERS, la SPE en modo convencional, la DLLME y la HF-LPME. Asimismo, emplear para el análisis de aguas métodos como la SPE (en modo convencional y dispersivo) y la HF-LPME.
- Estudiar la aplicación de nuevos materiales como son los MWCNTs como fases estacionarias en SPE, y de nuevos disolventes de extracción como son los ILs en DLLME.
- Validar las metodologías desarrolladas en base a estudios de calibración, repetibilidad, recuperación, precisión y exactitud.
- Obtener LODs y límites de cuantificación (LOQs) de los métodos que permitieran la determinación de residuos de plaguicidas y de algunos de sus metabolitos a los niveles requeridos por la UE (en el caso de las aguas) y a concentraciones del orden de ng/g (en el caso de los suelos).
- Aplicar las metodologías desarrolladas al análisis de los compuestos de interés en suelos con diferentes propiedades fisicoquímicas y aguas de diferente naturaleza.

CAPÍTULO III

PARTE EXPERIMENTAL

III.- PARTE EXPERIMENTAL

III.1.- REACTIVOS Y DISOLUCIONES

- Pirimicarb, pirifenox, penconazol, carbendazima, ametrina, ciromazina, pirimetanil y ciprodinil, calidad Pestanal, pureza >97,0% (Riedel-de Haën, Sigma-Aldrich). Las disoluciones de cada plaguicida se prepararon en MeOH a una concentración de 1000 mg/L, excepto la carbendazima que se preparó a 250 mg/L, y se almacenaron en ausencia de luz a 4 °C. Las disoluciones de trabajo se prepararon diariamente por diluciones apropiadas.

- Etoprofos, dimetoato, diazinón, malaoxón, metil-clorpirifos, fenitrotión, malatión, clorpirifos, fenamifos, buprofezín y fosmet, calidad Pestanal, pureza >93,1% (Riedel-de Haën, Sigma-Aldrich). Trifenil fosfato (TPP), utilizado como estándar interno (IS), pureza >98,0% (Fluka, Sigma-Aldrich). Las disoluciones de cada plaguicida y del IS se prepararon en ciclohexano a una concentración de 150 mg/L y 2,6 mg/L, respectivamente, y se almacenaron en ausencia de luz a 4 °C. Las disoluciones de trabajo se prepararon diariamente por diluciones apropiadas.

- Carbaril, fensulfotión, fenamifos, haloxifop, fipronil, profenofos, fonofos, disulfotón, nitrofen, terbufos, sulprofos y protiofos, calidad Pestanal, pureza >93,6% (Riedel-de Haën, Sigma-Aldrich). Mecoprop y diclofop, pureza >98,5% (Dr. Ehrenstorfer GmbH). Las disoluciones de cada plaguicida se prepararon en ACN a una concentración de 2000 mg/L y se almacenaron en ausencia de luz a 4 °C. Las disoluciones de trabajo se prepararon diariamente por diluciones apropiadas.

- 2-Aminobenzimidazol, carbendazima, benomilo, fuberidazol, 1-naftol y triazofos, calidad Pestanal, pureza >99,2% (Fluka, Sigma-Aldrich). Carbaril y tiabendazol, calidad Pestanal, pureza >66,5% (Riedel-de Haën, Sigma-Aldrich). Las disoluciones de cada plaguicida se prepararon en ACN a una concentración de 500 mg/L, excepto la carbendazima que se preparó en MeOH a 200 mg/L, y se almacenaron en ausencia de luz a 4 °C. Las disoluciones de trabajo se prepararon diariamente por diluciones apropiadas.

- Acetona, acetato de etilo, ACN, ciclohexano, DCM, dihexil éter, MeOH, *n*-hexano, tetrahidrofurano (THF), tolueno, 1-bromopentano y 1-octanol,

adquiridos en diversas casas comerciales (Merck, Scharlau, Panreac, Sigma-Aldrich y Carlo Erba).

- Citrato disódico sesquihidratado, citrato trisódico dihidratado, cloruro potásico (KCl), cloruro sódico (NaCl), dicromato potásico ($K_2Cr_2O_7$), dodecil sulfato sódico (SDS), hexafluorofosfato sódico ($NaPF_6$), hidrógeno fosfato de sodio dihidratado ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$), hidruro sódico (NaH), imidazol, ortofenantrolina monohidratada, sal de Mohr ($Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$), sulfato ferroso heptahidratado ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$), sulfato magnésico monohidratado ($MgSO_4 \cdot H_2O$) y sulfato sódico anhidro (Na_2SO_4), adquiridos en diversas casas comerciales (Sigma-Aldrich, Merck, Panreac y Janssen).
- Ácido clorhídrico (HCl), ácido fórmico, ácido *orto*-fosfórico (H_3PO_4), ácido perclórico ($HClO_4$), ácido sulfúrico (H_2SO_4) e hidróxido sódico (NaOH), adquiridos en diversas casas comerciales (Merck, Panreac y Carlo Erba).
- Hexafluorofosfato de 1-hexil-3-metilimidazolio ($[HMIIm][PF_6]$), pureza >97,0% (Sigma-Aldrich).
- Hexafluorofosfato de 1,3-dipentilimidazolio ($[PPIIm][PF_6]$), sintetizado como se indica en la sección III.6.5.
- Agua Milli-Q, obtenida en un sistema Milli-Q Gradiente A10 (Millipore Corporation).
- Disoluciones tampón de calibración para pH-metro, pH 4,0 y 7,0 (Sigma-Aldrich).
- Disolución 3 M de KCl para la conservación adecuada de la membrana del pH-metro (Crison).
- Disolución de calibración de KCl para conductímetro, 1413 $\mu S/cm$ (Crison).
- Disolución refrigerante basada en un fluido perfluorinado para termostatación del capilar en CE (Beckman Coulter).

III.2.- MATERIALES

- Capilares de sílice fundida de 50 μm y 100 μm de d.i., 363 μm de d.e. y 20 μm de recubrimiento de poliimida (Composite Metal Services).
- Columna capilar Equity-5 (poli (5% difenil/95% dimetilsiloxano) de sílice

fundida de 30 m de largo, 0,25 mm de d.i. y 0,25 μm de espesor (Supelco).

- Columna capilar JW Scientific DB-5MS (poli (5% difenil/95% dimetilsiloxano) de 30 m de largo, 0,25 mm de d.i. y 0,25 μm de espesor (Agilent Technologies).
- Columna para HPLC Nova-Pak C₁₈, *end-capped*, de 150 mm de largo, 3,9 mm de d.i. y 4 μm de tamaño de partícula (Waters).
- Precolumna para HPLC Guard-Pak C₁₈, *end-capped*, de 4 μm de tamaño de partícula (Waters).
- Micro-precolumna C₁₈ PepMap100 de 5 mm de largo, 300 μm de d.i., 5 μm de tamaño de partícula y 100 Å de tamaño de poro (LC Packings, Dionex).
- Fase estacionaria Pinnacle II Phenyl, *end-capped*, basada en sílice modificada con grupos fenilo de 3 μm de tamaño de partícula y 110 Å de tamaño de poro (Restek Corporation).
- MWCNTs con un d.e. de 10-15 nm, d.i. de 2-6 nm y longitud de 0,1-10 μm (Sigma-Aldrich).
- Cartuchos para SPE Sep-Pak Vac de 6 mL de capacidad que contenían 500 mg de sílice modificada con grupos C₁₈ (Waters).
- Membrana de fibra hueca de PP Accurel Q3/2, de 600 μm de d.i., 200 μm de espesor de pared y 0,2 μm de tamaño de poro (Membrana GmbH).
- Carbón vegetal en polvo, celita, arena, gel de sílice y PSA adquiridos en diversas casas comerciales (Panreac y Sigma-Aldrich).
- Filtros de membrana de tereftalato de polietileno (PET) de 0,20 μm (Chromafil Xtra PET-20/25) y de 0,40 μm (Chromafil Xtra PET-45/25) de diámetro de poro y 25 mm de diámetro total, para medios polares y no polares (Macherey-Nagel).
- Tubos de vidrio vacíos para SPE de 6 mL de capacidad, 7,5 cm de largo, 1,5 cm de d.e. y 1,2 cm de d.i. (Supelco).
- Fritados de politetrafluoroetileno (PTFE) de 20 μm de porosidad, 11,5 mm de diámetro y 3 mm de espesor (Supelco).
- Microjeringa de inyección en HPLC de 25 μL de capacidad con cuerpo de borosilicato y émbolo de acero (Hamilton).

- Jeringas Norm-Ject de 10 mL con tubo de PP y émbolo de polietileno (Henke Sass Wolf).

III.3.- EQUIPOS, INSTRUMENTOS Y APARATOS

III.3.1.- EQUIPO DE CE

Para los experimentos de CE se utilizó un equipo P/ACE MDQ equipado con un detector UV (Beckman Coulter) con filtros para 200, 214, 254 y 280 nm. La longitud del capilar hasta el detector fue de 50 cm, mientras que la longitud total fue de 60,2 cm.

III.3.2.- EQUIPOS DE GC

Los análisis por GC-NPD se llevaron a cabo en un cromatógrafo de gases 3800, equipado con un detector NPD y un muestreador automático 8200 (Varian). Para la separación se utilizó una columna capilar Equity-5.

Los análisis por GC-MS se realizaron en un cromatógrafo de gases 6890 N (Agilent Technologies), acoplado a un espectrómetro de masas de sector magnético VG Autospec (Micromass Instruments) operando en el modo de ionización por EI. La separación se llevó a cabo en una columna capilar DB-5MS.

III.3.3.- EQUIPO DE NANO-LC

Los análisis de nano-LC se realizaron con una unidad de HPLC capilar Ultimate de LC Packings (Dionex) equipada con una válvula de inyección manual con bucles (*loops*) externos de 5 y 20 μ L, una unidad de división de flujo, una nano-bomba y un detector UV capaz de monitorizar hasta cuatro longitudes de onda al mismo tiempo (entre 190 y 740 nm) con una nano-celda UZ-N10. Conjuntamente, se trabajó con una unidad de inversión de flujo para microcolumnas Switchos II Advance, que consistía en una válvula de inversión de flujo de diez puertos Cheminent modelo C2 (VICI Valco Instruments) y una micro-bomba Ultimate de LC Packings (Dionex). Las separaciones se realizaron en una columna capilar de 100 μ m de d.i. rellena de sílice ligada a grupos fenilo (longitud rellena: 25 cm, longitud efectiva: 25,5 cm) y como sistema de preconcentración en línea se utilizó un cartucho que contenía una micro-precolumna C₁₈.

III.3.4.- EQUIPO DE HPLC

Los análisis por HPLC se realizaron en un cromatógrafo de líquidos equipado con una bomba binaria modelo 1525, un muestreador automático modelo 717 plus y un detector de fluorescencia modelo 2475 Multi λ (Waters). Las separaciones se llevaron a cabo en una columna Nova-Pak C₁₈ utilizando una precolumna con la misma fase estacionaria.

III.3.5.- OTROS EQUIPOS Y APARATOS

- Agitador magnético Asincro 7000379, agitación máxima de 1600 rpm (Selecta).
- Agitador vórtex Lab Dancer de velocidad fija a 2800 rpm (VWR).
- Balanza analítica AW-224 con legibilidad de 0,1 mg y capacidad de pesada de 220 g (Sartorius).
- Balanza de precisión CP2202S con legibilidad de 0,01 g y capacidad de pesada de 2200 g (Sartorius).
- Baño de ultrasonidos Ultrasons-512, frecuencia 50/60 Hz (Selecta).
- Baño de ultrasonidos 3510E-MT con control de tiempo y frecuencia de 40 kHz (Branson).
- Bomba de HPLC 10-LC (Perkin-Elmer).
- Bomba de vacío N 840.3 FT.40.18 (Laboport).
- Centrífuga 5702 para tubos de 15 y 50 mL con control de tiempo y velocidad máxima de 4400 rpm (3000 x *g*) (Eppendorf).
- Conductímetro portátil CM 35 con medida de salinidad y sensor de temperatura en la célula para compensación automática en las medidas (Crison).
- Espectrómetro RMN Bruker Avance 500MHz, con tres canales de radiofrecuencia, accesorio de gradiente Z, control ultraestable de la temperatura y unidad de temperatura variable (Bruker).
- Estufa WTB-7200 de 100 L de capacidad (Binder).
- pH-metro GLP 22 con electrodo combinado de pH y sensor de temperatura (Crison).

- Rotavapor R-200 con baño termostático B-490, bomba de vacío V-500 y controlador de vacío V-800 (Büchi Labortechnik).
- Sistema de purificación de agua, Milli-Q Gradient A10 (Millipore).
- Sistema de vacío para SPE Visiprep-DL con capacidad para 12 muestras simultáneas (Supelco).

III.4.- PROGRAMAS INFORMÁTICOS

- Programa *32 Karat* (Beckman Coulter) v. 8.0 para el control, visualización de datos adquiridos, integración de picos, etc. del equipo de CE.
- Programa *Varian Star Workstation* (Varian) v. 6.41 para el control, visualización de datos adquiridos, integración de picos, etc. del equipo de GC.
- Programa *Empower 2* (Waters) v. 6.0 para el control, visualización de datos adquiridos, integración de picos, etc. del equipo de HPLC.
- Programa *Chromeleon* (Dionex) v. 6.6 que permite el control, visualización de datos adquiridos, integración de picos, etc. del equipo de nano-LC.
- Programa *StatGraphics Plus* v. 5.1 para la elaboración y estudio de los diseños experimentales y la comparación de las curvas de calibrado.
- Programa *Microsoft Excel 2010* para la elaboración de hojas de cálculo, obtención y representación de las curvas de calibrado, etc.
- Programa *Microsoft PowerPoint 2010* para la preparación de las figuras.
- Programa de búsqueda de espectros de masas *NIST* v. 2.0 para acceder a la librería espectral *NIST/EPA/NIH*, con más de 150 000 espectros de masas para compuestos estándar.

III.5.- MUESTRAS

Las muestras de tipo medioambiental que se han utilizado a lo largo del desarrollo de esta Tesis Doctoral (capítulo IV) fueron las siguientes:

- Agua mineral, adquirida en supermercados de la isla de Tenerife.
- Agua de escorrentía, procedente de una zona agrícola situada en las afueras del municipio de La Laguna (Tenerife).

- Suelos forestales, recogidos en zonas boscosas de los municipios de El Rosario y La Laguna (Tenerife).
- Suelos ornamentales, adquiridos en viveros de la isla de Tenerife.
- Suelos agrícolas, recogidos en zonas de cultivo de platanera y papas de la isla de Tenerife.
- Suelo de jardín, recogido en una zona pública del municipio de La Laguna (Tenerife).
- Suelo de tipo lapilli, recogido en el municipio de Guía de Isora (Tenerife).

III.6.- PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

III.6.1.- CARACTERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS DE SUELO

Las muestras de suelo fueron caracterizadas con objeto de determinar algunas de sus propiedades fisicoquímicas más relevantes, tal como se indica a continuación.

Determinación del pH en agua (MÉTODOS OFICIALES DE ANÁLISIS, MAPA). Se suspendieron 10 g de suelo en 25 mL de agua (relación 1:2,5 p/v), se agitó mediante un agitador magnético a 1000 rpm durante 10 min y se dejó en reposo durante 30 min. Justo antes de medir el pH del sobrenadante, la mezcla se agitó durante unos segundos.

Determinación del pH en KCl (MÉTODOS OFICIALES DE ANÁLISIS, MAPA). Se suspendieron 10 g de suelo en 25 mL de una disolución 0,1 N de KCl (relación 1:2,5 p/v), se agitó mediante un agitador magnético a 1000 rpm durante 10 min y se dejó en reposo durante 30 min. Justo antes de medir el pH del sobrenadante, la mezcla se agitó durante unos segundos.

Determinación de la conductividad (MÉTODOS OFICIALES DE ANÁLISIS, MAPA). Se suspendieron 10 g de suelo en 50 mL de agua (relación 1:5 p/v), se agitó mediante un agitador magnético a 1000 rpm durante 30 min y se dejó en reposo hasta que el sólido se depositó. A continuación, el sobrenadante se filtró con papel de filtro y se midió la conductividad del filtrado.

Determinación del porcentaje de humedad (METSON, 1961). Se pesaron

aproximadamente 10 g de suelo homogeneizado y secado al aire a temperatura ambiente en un crisol, y se colocaron en estufa a 105 °C durante 24 h. Seguidamente, se colocaron en un desecador hasta llegar a temperatura ambiente y se pesaron tras alcanzar peso constante.

Determinación del porcentaje de carbono orgánico por el método Walkley-Black (PAGE Y COLS., 1987). Se pesó 1 g de suelo y se añadieron 10 mL de una disolución 1 N de $K_2Cr_2O_7$ y 20 mL de H_2SO_4 concentrado. La mezcla se agitó durante 30 min y se dejó en reposo durante algunos minutos. A continuación, se añadieron 100 mL de agua Milli-Q y 10 mL de H_3PO_4 concentrado y se agitó durante 5 min. Esta disolución fue valorada por retroceso con sal de Mohr a una concentración de 0,5 N, utilizando la ortofenantrolina como indicador. Éste último se preparó disolviendo 0,148 mg de ortofenantrolina monohidratada y 0,07 g de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ en 10 mL de agua. El resultado final del porcentaje de C orgánico se multiplicó por un factor de recuperación de acuerdo con la técnica operatoria seguida, que en este caso tiene un valor de 1,29 (suponiendo un 77% de recuperación de carbono orgánico de la muestra).

Determinación del porcentaje de materia orgánica (PORTA CASANELLAS Y COLS., 1986). Una vez obtenido el porcentaje de carbono orgánico, el de materia orgánica se determinó multiplicando éste por el factor de van Bemmelen (1,72), deducido estadísticamente y que supone que la materia orgánica del suelo contiene un 58% de carbono orgánico.

III.6.2.- PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES EN LAS SEPARACIONES POR CE

Acondicionamiento de los capilares (sección IV.1). Antes de su primer uso, los capilares de sílice fundida se activaron haciendo pasar por presión HCl 1,0 M durante 2 min, agua Milli-Q durante 2 min, NaOH 0,1 M durante 5 min, de nuevo agua Milli-Q durante 2 min y por último BGE, previamente filtrado a través de un filtro de membrana de 0,45 μm de PET, durante 3 min. Todos los lavados se realizaron a 20 psi.

Separación electroforética por NACE-UV (sección IV.1). La separación mediante NACE se llevó a cabo utilizando un BGE no acuoso que consistía en una mezcla de composición 1:2 (v/v) MeOH/ACN, conteniendo 90 mM de SDS y 20,5 mM de $HClO_4$. La inyección electrocinética se realizó aplicando +10 kV durante 12

s, disolviendo la muestra o la disolución estándar correspondiente en una mezcla de composición 78:22 (v/v) MeOH/ACN conteniendo 1,11 mM de HClO_4 , manteniéndola a 10 °C hasta su inyección. La detección se realizó a 214 nm.

Protocolo de lavado de los capilares (sección IV.1). Al inicio de cada día, el capilar se acondicionó con NaOH 0,1 M durante 3 min, agua Milli-Q durante 2 min y BGE durante 5 min. Entre inyecciones se aplicó un lavado con agua Milli-Q durante 0,5 min, NaOH 0,1 M durante 1,5 min, de nuevo agua Milli-Q durante 1 min y BGE durante 1 min más. Al final del día, el capilar se lavó durante 2 min con MeOH y durante otros 2 min con agua Milli-Q.

Preparación de las muestras de agua (sección IV.1). El pH de las muestras de agua Milli-Q o agua mineral se ajustó a 8,0 haciendo uso de una disolución 0,1 M de NaOH, para luego someterlas al procedimiento de SPE que se describe a continuación.

Procedimiento de SPE para las muestras de agua (sección IV.1). Los cartuchos empleados fueron fabricados manualmente introduciendo 40 mg de MWCNTs (previamente secados a 120 °C en estufa y enfriados en desecador) en un tubo de vidrio con fritados de PTFE a ambos lados para retener la fase estacionaria (Figura III.1).

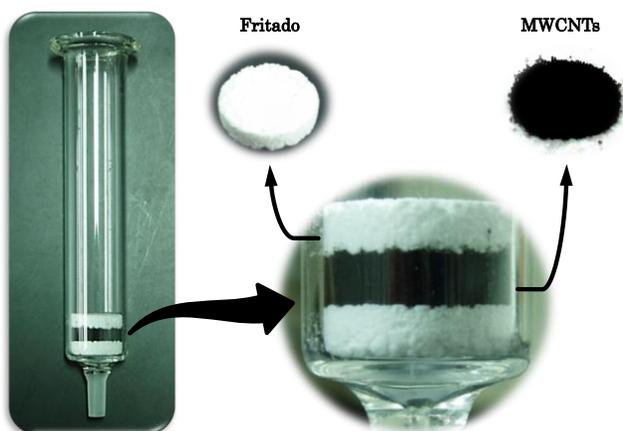


Figura III.1.- Cartucho de SPE con MWCNTs fabricado en el laboratorio.

La activación del cartucho se realizó con 10 mL de ACN, seguidos de 10 mL de agua Milli-Q. A continuación, 100 mL de agua Milli-Q o 750 mL de agua mineral a pH 8,0 se pasaron a través del cartucho. Cuando se completó el paso

de retención, el cartucho se secó durante 20 min a vacío de -20 mmHg. La secuencia de elución óptima fue la siguiente: 10 mL de ACN y 20 mL de DCM, ambos con un 5% (v/v) de ácido fórmico. Los disolventes orgánicos se recogieron conjuntamente en un erlenmeyer y se evaporaron hasta sequedad a 40 °C y 205 mbar en rotavapor. El residuo se disolvió añadiendo los volúmenes apropiados de las disoluciones del IS y del medio de la muestra (78:22 (v/v) ACN/MeOH, 1,11 mM HClO₄) para alcanzar un volumen final de 1 mL.

III.6.3.- PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES EN LAS SEPARACIONES POR GC

Separación cromatográfica por GC-NPD (secciones IV.2 Y IV.4). La separación cromatográfica se llevó a cabo utilizando nitrógeno como gas portador a un flujo de 1,0 mL/min y como gas auxiliar o de *make up* a 30 mL/min. El detector NPD se mantuvo a 320 °C y el flujo de hidrógeno a 4 mL/min. Un volumen de 2,0 µL de disolución de muestra o estándar se inyectó en modo *split/splitless* a una temperatura de 280 °C. El *split* se mantuvo inicialmente cerrado hasta 0,75 min. A partir de ese momento, se abrió a una relación de 1/50. Para la separación cromatográfica se siguió el programa de temperatura indicado en la Tabla III.1, siendo el tiempo total de análisis de 43,3 min.

Tabla III.1.- Programa de temperatura empleado en las separaciones por GC.

| Tiempo (min) | Temperatura (°C) | Rampa (°C/min) |
|--------------|------------------|----------------|
| 0 | 120 | - |
| 3 | 120 | 7 |
| 17,3 | 220 | - |
| 22,3 | 220 | - |
| 38,3 | 300 | 5 |
| 43,3 | 300 | - |

Separación cromatográfica por GC-MS (sección IV.4). La inyección y programa de temperatura fueron análogos a las utilizadas en la separación por GC-NPD. El detector de masas operó en modo de ionización por EI. La fuente de iones se mantuvo a 230 °C y la ionización tuvo lugar por impacto de electrones a 70 eV.

Preparación de las muestras de suelo (secciones IV.2 y IV.4). Las diferentes muestras de suelo (forestal, agrícola y ornamental) se homogeneizaron, se tamizaron a través de una malla de 2 mm y se dejaron secar al aire a temperatura ambiente.

Extracción de las muestras de suelo (sección IV.2). Se pesaron 1,5 g de suelo en un tubo de centrifuga de 50 mL, se añadieron 10 mL de una mezcla 1:1 (v/v) MeOH/ACN y se extrajo en un baño de ultrasonidos durante 15 min. A continuación, se centrifugó durante 10 min a 4400 rpm (3000 x *g*) y se filtró a través de un filtro de membrana 0,45 μm de PET. El extracto se evaporó hasta sequedad a 40 °C y 250 mbar en rotavapor y se reconstituyó en 20 mL de agua Milli-Q, ajustando el pH a 6,0 con una disolución 0,1 M de NaOH. Posteriormente, los extractos fueron sometidas al procedimiento de SPE que se describe a continuación.

Procedimiento de SPE para los extractos de suelo (sección IV.2). Los cartuchos se fabricaron manualmente como se indica en la sección III.6.2, pero en este caso introduciendo porciones de 100 mg de MWCNTs (previamente secados a 120 °C en estufa y enfriados en desecador). La activación del cartucho se realizó con 10 mL de ACN seguidos de 10 mL de agua Milli-Q. A continuación, se pasaron a través del cartucho los 20 mL de extracto de suelo a pH 6,0 y se secó durante 20 min a vacío de -20 mmHg. Los analitos retenidos se eluyeron con 20 mL de DCM, que posteriormente se evaporaron hasta sequedad a 40 °C y 700 mbar en rotavapor. El residuo se disolvió añadiendo los volúmenes apropiados de la disolución del IS y ciclohexano hasta alcanzar un volumen final de 1 mL y, tras añadir una pequeña cantidad de Na₂SO₄ anhidro, se filtró a través de un filtro de membrana de 0,20 μm de PET.

Extracción de las muestras de suelo mediante el método QuEChERS (sección IV.4). Se pesaron 10 g de suelo en un tubo de centrifuga de 50 mL y se añadió el volumen apropiado de la disolución del IS. Después de unos minutos, se añadieron 20 mL de ACN y se agitó vigorosamente durante 1 min. A continuación, se añadieron 4 g de MgSO₄·H₂O, 1 g de NaCl, 1 g de citrato trisódico dihidratado y 0,5 g de citrato disódico sesquihidratado. De nuevo la mezcla se agitó durante 10 s, se introdujo en un baño de ultrasonidos durante 5 min y se centrifugó a 4400 rpm (3000 x *g*) durante 8 min. Seguidamente, se llevó a cabo una etapa de limpieza mediante dSPE añadiendo el sobrenadante (aproximadamente 10 mL) a un tubo de centrifuga de 15 mL que contenía 1,5 g de MgSO₄·H₂O y 0,250 g de PSA, se agitó durante unos segundos y se sometió a ultrasonidos durante 1 min. Posteriormente, se centrifugó a 4400 rpm (3000 x *g*)

durante 10 min y el sobrenadante se evaporó hasta sequedad a 40 °C y 200 mbar en rotavapor. El residuo se disolvió en 1 mL de ciclohexano y, tras añadir una pequeña cantidad de Na₂SO₄ anhidro, se filtró a través de un filtro de membrana de 0,20 µm de PET. La Figura III.2 muestra un esquema del procedimiento.

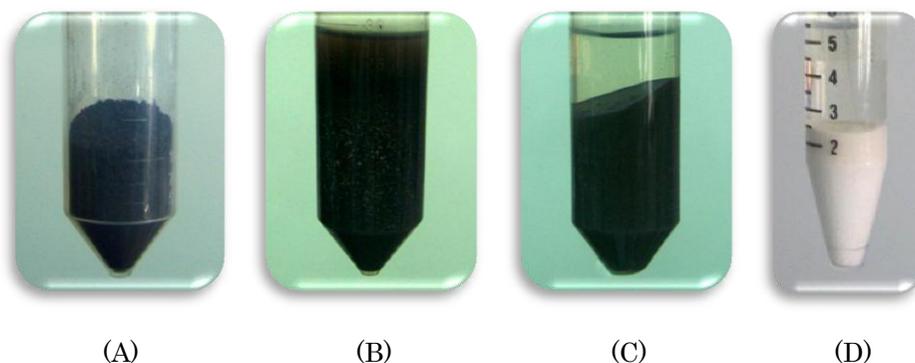


Figura III.2.- Etapas del procedimiento QuEChERS. Aspecto que mostró la muestra (A) antes de ser tratada; (B) tras la adición del ACN y la mezcla de sales (MgSO₄, NaCl y citratos); (C) tras la centrifugación de la muestra; (D) tras la centrifugación después de llevar a cabo la etapa de limpieza con MgSO₄ y PSA.

III.6.4.- PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES EN LAS SEPARACIONES POR NANO-LC

Preparación de las columnas cromatográficas (sección IV.3). Las columnas se fabricaron manualmente rellenando capilares de sílice fundida de 100 µm de d.i. x 375 µm d.e. con partículas de sílice modificadas con grupos fenilo, utilizando el método *slurry* (FANALI Y COLS., 2007). Para ello, un extremo del capilar se cerró con un fritado mecánico (Valco) para retener la fase estacionaria, mientras que el otro se ensambló a un dispositivo que contenía el *slurry* (5 cm x 4,1 mm d.i.). Este último se preparó suspendiendo aproximadamente 20 mg de fase estacionaria en 1 mL de acetona y sometiendo a ultrasonidos durante 10 min. Esta mezcla se transfirió al contenedor y se bombeó mediante una bomba de HPLC a través del capilar utilizando MeOH como disolvente a una presión máxima de 35 MPa. Para obtener un lecho homogéneo de fase estacionaria, el capilar se mantuvo bajo ultrasonidos durante todo el proceso (Figura III.3).

Tras empaquetar 30 cm de capilar, la presión se disminuyó y el sistema se lavó y compactó varias veces con acetona. Finalmente, se lavó durante 15 min con una disolución 5 mM de NaCl para obtener fritados con una adecuada

permeabilidad y estabilidad. Los dos fritados definitivos se obtuvieron poniendo en contacto durante 5 s el capilar con un alambre calentado eléctricamente a 700 °C (Figura III.4). La ventana de detección se preparó eliminando la poliimida del capilar con una cuchilla, visualizando en todo momento a través de un microscopio, y la columna se cortó al tamaño deseado.

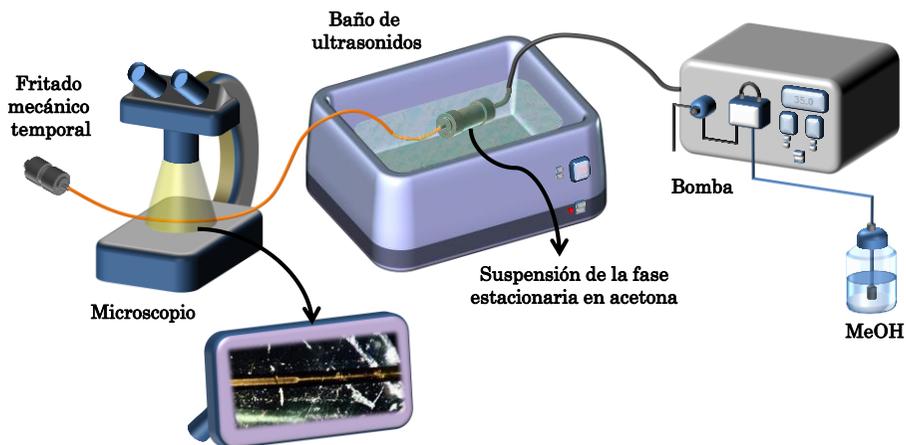


Figura III.3.- Primera etapa de la preparación de las columnas capilares rellenas mediante el método *slurry* (relleno).

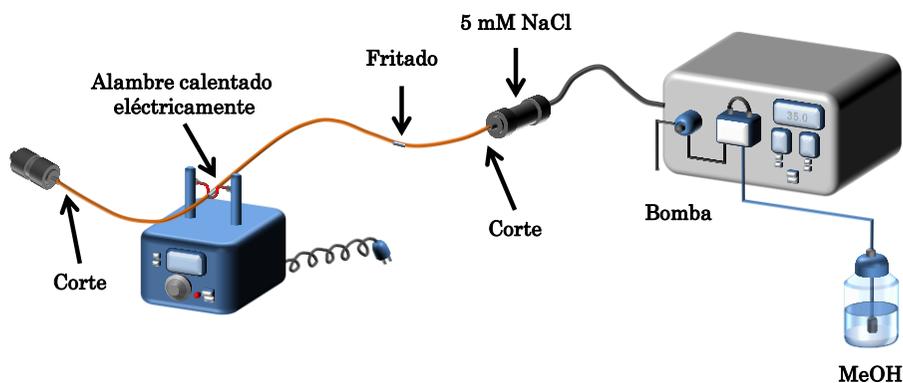


Figura III.4.- Segunda etapa de la preparación de las columnas capilares rellenas mediante el método *slurry* (compactación, generación de los fritados y corte).

Condiciones de inyección en nano-LC-UV (sección IV.3). En la configuración final optimizada, se inyectaron 20 μL de muestra o de los estándares disueltos en una mezcla 90:10 (v/v) agua/ACN. Este volumen se cargó durante 2 min en la precolumna a una velocidad de flujo de 35 $\mu\text{L}/\text{min}$, utilizando agua con un 0,1% (v/v) de ácido fórmico como disolvente de carga

impulsado por la micro-bomba. Una vez que la muestra fue introducida en la precolumna, la válvula de inversión se cambió de posición para conectar la nano-bomba con la precolumna, y ésta con la columna analítica. De esta forma, los analitos fueron arrastrados mediante la fase móvil proveniente de la nano-bomba desde la precolumna hacia la columna a un flujo de 500 nL/min. Después de 4,5 min, la precolumna se colocó fuera de línea y la nano-bomba se conectó directamente con la columna analítica mediante la válvula de inversión. Mientras tanto, la precolumna se lavó con ACN durante 10 min, y luego se acondicionó de nuevo con agua que contenía un 0,1% (v/v) de ácido fórmico. La Figura III.5 muestra un esquema del equipo de nano-LC utilizado.

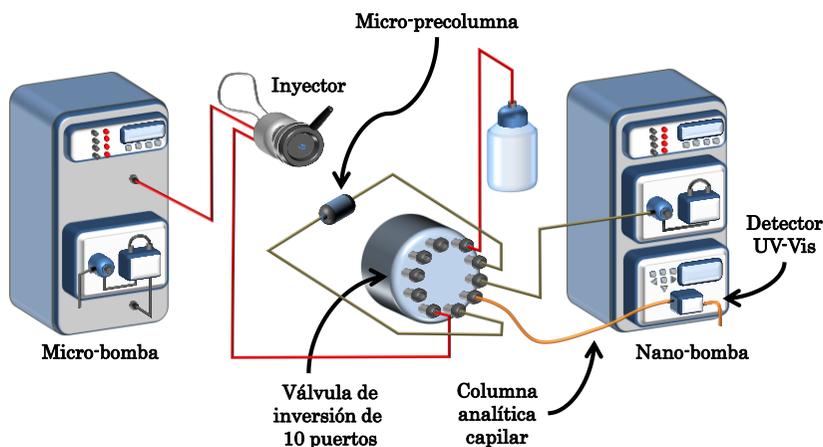


Figura III.5.- Esquema del equipo de nano-LC.

Separación cromatográfica por nano-LC-UV (sección IV.3). La separación óptima se consiguió aplicando el gradiente indicado en la Tabla III.2 a un flujo de 500 nL/min utilizando ACN como fase móvil A y agua como fase móvil B, ambas conteniendo un 0,1% (v/v) de ácido fórmico. La detección se realizó a 200 nm.

Tabla III.2.- Programa de elución en gradiente empleado en nano-LC.

| Tiempo (min) | % A | % B | Curva |
|--------------|-----|-----|-------|
| 0 | 45 | 55 | 6 |
| 1 | 45 | 55 | 6 |
| 6 | 59 | 41 | 6 |
| 12 | 59 | 41 | 6 |
| 25 | 100 | 0 | 6 |
| 30 | 100 | 0 | 6 |
| 35 | 45 | 35 | 6 |

Preparación de las muestras de agua (sección IV.3). El pH de las muestras de agua Milli-Q se ajustó a 4,0 haciendo uso de una disolución 0,1 M de HCl, para luego someterlas al procedimiento de dSPE que se describe a continuación.

Procedimiento de dSPE para las muestras de agua (sección IV.3). En las condiciones optimizadas, 100 mL de agua Milli-Q ajustados a pH 4,0 se añadieron a un matraz aforado donde previamente se habían pesado 90 mg de MWCNTs. Tras 15 min de extracción con agitación, la suspensión se transfirió a una columna de vidrio que contenía en el fondo dos fritados de PTFE. La parte inferior de la columna se conectó a una bomba de vacío, de modo que la muestra de agua fue filtrada rápidamente, mientras que los MWCNTs permanecieron en la columna de vidrio. Consecutivamente, otro fritado de PTFE se insertó en la parte superior de la fase estacionaria y el cartucho se secó durante 20 min a vacío de -20 mmHg. La elución se llevó a cabo por gravedad utilizando 35 mL de DCM, que posteriormente se evaporaron a sequedad a 40 °C y 700 mbar en rotavapor. El residuo se disolvió en 1200 μ L de una mezcla 90:10 (v/v) agua/ACN. La Figura III.6 muestra un esquema del procedimiento llevado a cabo.

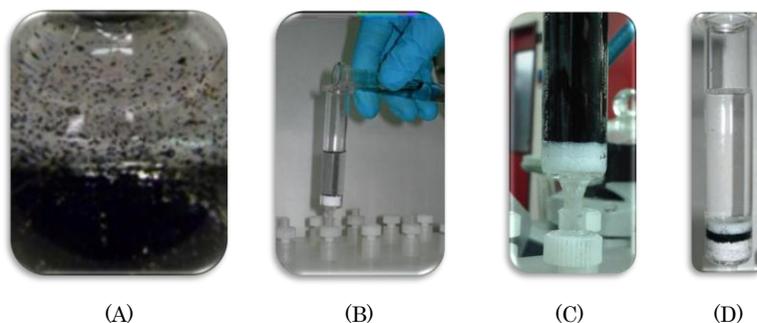


Figura III.6.- Detalles del procedimiento de dSPE. (A) Suspensión/dispersión de los MWCNTs en la muestra acuosa. (B) y (C) Transferencia de la suspensión a la columna de vidrio. (D) Elución.

Procedimiento de SPE para las muestras de agua (sección IV.3). La activación de los cartuchos Sep-Pak Vac se realizó con 10 mL de ACN, seguidos de 10 mL de agua Milli-Q. A continuación, se pasaron a través del cartucho 100 mL de agua Milli-Q a pH 4,0. Cuando se completó el paso de retención, el cartucho se secó durante 20 min a vacío de -20 mmHg. La elución se realizó con 10 mL de ACN, que fue posteriormente evaporado hasta sequedad a 40 °C y 205 mbar en rotavapor. El residuo se disolvió en 1200 μ L de una mezcla 90:10 (v/v) agua/ACN.

III.6.5.- PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES EN LAS SEPARACIONES POR HPLC

Separación cromatográfica por HPLC-FD (secciones IV.5 y IV.6). La separación se realizó en régimen de gradiente, utilizando ACN como fase móvil A y una disolución 10 mM de fosfato a pH 8,70 como fase móvil B, según el programa indicado en la Tabla III.3. La velocidad de flujo se mantuvo a 1,0 mL/min y el volumen de inyección fue de 20 μ L. Para la detección, se configuró un programa adecuado de longitudes de onda (ver Tabla III.4) basado en los espectros de excitación/emisión de los analitos y se trabajó en modo multicanal para registrar varios cromatogramas de forma simultánea.

Tabla III.3.- Programa de elución en gradiente empleado en las separaciones por HPLC.

| Tiempo (min) | % A | % B | Curva |
|--------------|-----|-----|-------|
| 0 | 22 | 78 | 6 |
| 3 | 22 | 78 | 10 |
| 8 | 36 | 64 | 6 |
| 10 | 36 | 64 | 6 |
| 13 | 60 | 40 | 6 |
| 14 | 60 | 40 | 6 |
| 19 | 100 | 0 | 6 |
| 25 | 100 | 0 | 6 |
| 30 | 22 | 78 | 6 |

Tabla III.4.- Programa de longitudes de onda de excitación (λ_{ex}) y de emisión (λ_{em}) empleado en las separaciones por HPLC-FD.

| | Tiempo (min) | λ_{ex} (nm) | λ_{em} (nm) |
|----------------|--------------|---------------------|---------------------|
| | 0-3 | 275 | 310 |
| | 3-4,2 | 280 | 300 |
| Canal 1 | 4,2-8 | 305 | 335 |
| | 8-14 | 280 | 320 |
| | 14-19 | 250 | 305 |
| Canal 2 | 0-19 | 285 | 460 |

Síntesis y purificación del [PPI_m][PF₆] (sección IV.5). La ruta sintética de este IL se realizó en dos pasos (ver Figura III.7). Se tomaron 3,25 g de NaH eliminando con *n*-hexano el aceite mineral en el que venía conservado comercialmente. Esta cantidad de hidruro se añadió a 71,5 mL de THF y se agitó mediante un agitador magnético a 500 rpm. A continuación, una disolución de 7,15 g de imidazol en 71,5 mL de THF a 0 °C se añadió gota a gota a la mezcla anterior bajo atmósfera inerte. La reacción se dejó transcurrir durante 2 h bajo

agitación constante. Seguidamente, se añadieron gota a gota 26,8 mL de 1-bromopentano a temperatura ambiente, y la mezcla se mantuvo durante 7 h a reflujo. Tras filtración a través de celita, el filtrado se concentró utilizando un rotavapor y el residuo se disolvió en DCM. Por último, se purificó haciendo pasar este residuo a través de una columna cromatográfica clásica de 4 cm de d.i. rellena con 1 cm de arena de mar, 4 cm de gel de sílice, 2 cm de celita y 10 cm de carbón vegetal, previamente impregnada con DCM. El residuo concentrado, eluido también con DCM, se lavó con *n*-hexano y se secó a vacío, obteniéndose el compuesto [PPIIm][Br] con un 88% de rendimiento.

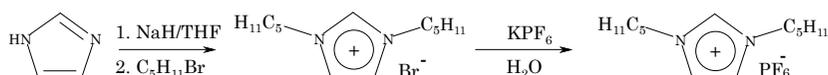


Figura III.7.-. Síntesis del [PPIIm][PF₆] utilizado en esta Tesis.

Seguidamente, se llevó a cabo un intercambio aniónico añadiendo 15 g de NaPF₆ a una disolución de 20 g de [PPIIm][Br] en 400 mL de agua. Tras 30 min, la capa de IL formada en el fondo se separó y se disolvió en 40 mL de DCM. Esta disolución se lavó con dos porciones de 50 mL de agua y se evaporó a vacío. El residuo se disolvió de nuevo en DCM y se purificó y lavó del mismo modo descrito para el [PPIIm][Br]. El residuo final se secó a vacío obteniendo el compuesto [PPIIm][PF₆] con un 94% de rendimiento.

Preparación de las muestras de suelo (secciones IV.5 y IV.6). Las diferentes muestras de suelo (forestal, ornamental, de jardín y lapilli) se homogeneizaron, se tamizaron a través de una malla de 2 mm y se dejaron secar al aire a temperatura ambiente.

Extracción de las muestras de suelo (secciones IV.5 y IV.6). Previamente a los procedimientos de IL-DLLME y HF-LPME que se detallan a continuación, se realizó una extracción de los analitos del suelo. Para ello, se pesaron 3 g de suelo en un tubo de centrifuga de 50 mL, se añadieron 20 mL de MeOH conteniendo 2,5% (p/v) de NaCl y se agitó durante 1 min. La extracción fue asistida mediante ultrasonidos durante 10 min y se centrifugó a 4400 rpm (3000 x *g*). El sobrenadante se filtró a través de un filtro de membrana de 0,45 μm de PET y se repitió la misma extracción para el sólido remanente. Ambos sobrenadantes se recolectaron y evaporaron a sequedad a 40 °C y 235 mbar en rotavapor. El

residuo se disolvió en 10 mL de agua Milli-Q y se filtró a través de un filtro de membrana de 0,20 μm de PET. A continuación, los extractos acuosos fueron sometidos a uno de los siguientes procedimientos.

Procedimiento IL-DLLME para los extractos de suelo (sección IV.5). A los 10 mL de extracto de suelo se añadieron 3 g de NaCl (cuando se utilizó el [HMIIm][PF₆]) como posterior disolvente de extracción) ó 2,5 g de NaCl (cuando se utilizó el [PPIIm][PF₆]) y el pH se ajustó a 5,20 utilizando disoluciones 0,1 M de HCl o NaOH. Esta disolución fue transferida a un tubo de centrifuga de 15 mL y a continuación, se añadió rápidamente una mezcla de 117,5 mg de [HMIIm][PF₆] ó [PPIIm][PF₆] en 418 μL de MeOH. Se agitó durante 1 min en agitador vórtex y, tras 8 min de extracción, la mezcla se centrifugó a 4400 rpm (3000 x g) durante 10 min. A continuación la fase acuosa sobrenadante se eliminó haciendo uso de una pipeta, mientras que la fase depositada (80 μL de IL que contenían los analitos) fue transferida a un vial y se disolvió en 1120 μL de una mezcla 59:41 (v/v) ACN/10 mM de fosfato a pH 8,70 (cuando se utilizó el [HMIIm][PF₆]) ó 72:28 (v/v) de la misma mezcla (cuando se utilizó el [PPIIm][PF₆]). La Figura III.8 muestra un detalle de la dispersión producida en el procedimiento IL-DLLME, así como del IL depositado tras la correspondiente centrifugación.

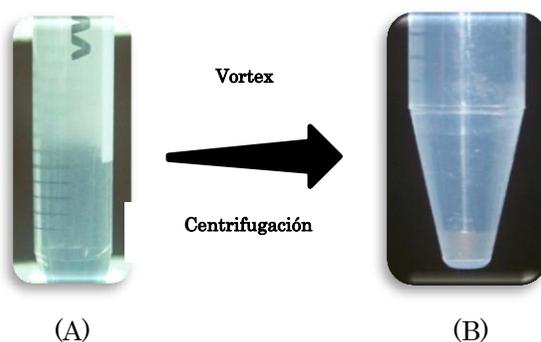


Figura III.8.- (A) Detalle de la dispersión tras añadir la mezcla del IL con el disolvente dispersante. (B) Detalle de la fase depositada tras la centrifugación.

Procedimiento HF-LPME para los extractos de suelo (sección IV.6). A los 10 mL de extracto de suelo se añadieron 2 g de NaCl y el pH se ajustó a 9,0 utilizando una disolución 0,5 M de NaOH. Un fragmento de 2 cm de fibra hueca de PP se insertó en el extremo de la aguja de una microjeringa Hamilton de 25 μL que previamente se había rellenado con 20 μL de 1-octanol. El 1-octanol se

introdujo lentamente en la fibra, permitiendo la difusión del disolvente a través de los poros de la misma para generar la SLM. Una vez que la membrana estuvo convenientemente impregnada, se continuó introduciendo 1-octanol hasta que el interior de la fibra quedara relleno (lo que se pudo apreciar visualmente), agotando el disolvente que contenía la jeringa. Posteriormente, la fibra se introdujo en el extracto acuoso de suelo y se llevó a cabo la extracción a temperatura ambiente durante 30 min con una agitación de 1440 rpm. A continuación, se retrajo el disolvente contenido en el interior de la fibra (aproximadamente 7 μL) con la jeringa, se introdujo en un vial y se evaporó bajo una corriente de nitrógeno. El residuo se disolvió en 50 μL de una mezcla 22:78 (v/v) ACN/10 mM de fosfato a pH 8,70.

Preparación de las muestras de agua (sección IV.6). Tras filtrarlas a través de un filtro de membrana de 0,20 μm de PET, el pH de las muestras de agua Milli-Q, agua mineral o de escorrentía se ajustó a 9,0 haciendo uso de una disolución 0,1 M de NaOH, para luego someterlas al procedimiento de HF-LPME descrito a continuación.

Procedimiento HF-LPME para las muestras de agua (sección IV.6). A 20 mL de cada tipo de agua se añadieron 4 g de NaCl y el pH se ajustó a 9,0 utilizando una disolución 0,5 M de NaOH. Un fragmento de 3 cm de fibra hueca de PP se insertó en el extremo de la aguja de una jeringa Hamilton de 25 μL y se llevó a cabo un procedimiento idéntico al descrito para los extractos de suelo, trayendo esta vez aproximadamente 10 μL de 1-octanol del interior de la fibra. La Figura III.9 muestra una fotografía de las fibras utilizadas, así como de una extracción HF-LPME.

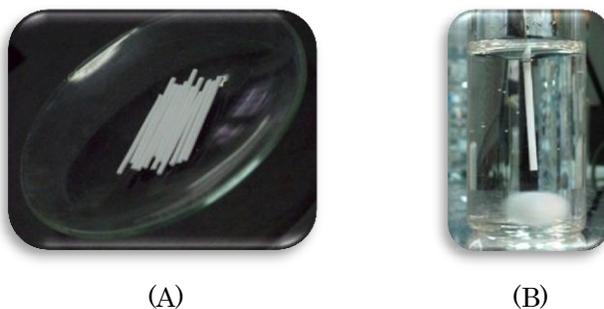


Figura III.9.- (A) Conjunto de fibras de 2 cm cortadas y preparadas para llevar a cabo el procedimiento HF-LPME. (B) Detalle del procedimiento experimental de la HF-LPME, tanto de las muestras de agua como de los extractos acuosos de los diferentes tipos de suelo.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1.- ANÁLISIS DE PLAGUICIDAS EN AGUAS POR ELECTROFORESIS CAPILAR EN MEDIO NO ACUOSO UTILIZANDO NANOTUBOS DE CARBONO DE PARED MÚLTIPLE COMO FASES ESTACIONARIAS EN EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

En la presente sección se presenta la determinación de un grupo de siete plaguicidas pertenecientes a diferentes familias (pirimicarb, pirifenox, penconazol, carbendazima, ciromazina, pirimetanil y ciprodinil) en agua mineral mediante NACE-UV. La metodología propuesta incluye un procedimiento de preconcentración fuera de línea utilizando la SPE con MWCNTs como fases estacionarias, así como una preconcentración en línea haciendo uso de la inyección electrocinética. El método permite la determinación de estos plaguicidas a una concentración inferior al LMR establecido por la legislación de la UE. Se trata de la primera vez que estos plaguicidas se separan mediante NACE y se extraen mediante SPE con CNTs como fases estacionarias. Asimismo, este trabajo constituye la primera aplicación del uso combinado de MWCNTs-SPE y CE para el análisis de plaguicidas.

IV.1.1.- ANTECEDENTES

Como se indicó en el Capítulo I, la CE en el modo NACE aprovecha las ventajas físicas y químicas de los disolventes orgánicos para controlar el EOF y la migración de los analitos. La elección correcta de un disolvente o de la mezcla de ellos permite separaciones mucho más selectivas que en medio acuoso, ya que las interacciones dipolares y los puentes de hidrógeno son más significativos en medio orgánico. Por otra parte, facilita la disolución de compuestos no solubles en agua y permite la separación de analitos con movilidad electroforética similar en medios acuosos. Además, la obtención de valores bajos de corriente permite la aplicación de voltajes más altos, el uso de concentraciones elevadas de electrolitos y el empleo de capilares con mayor d.i. Por otro lado, NACE ha demostrado ser el modo de CE con mayor compatibilidad con la MS (YANG Y COLS., 1999).

En cuanto a las aplicaciones de NACE al campo medioambiental, sólo algunos trabajos habían sido publicados hasta el momento del desarrollo de la

presente Tesis Doctoral, e incluían la determinación de triazinas en aguas (CARABIAS-MARTÍNEZ Y COLS., 1999, 2000, 2002, 2006b) y en verduras (CARABIAS-MARTÍNEZ Y COLS., 2007; RODRÍGUEZ-GONZALO Y COLS., 2009) utilizando para la separación BGEs que contenían SDS y HClO_4 en MeOH/ACN. Por otra parte, se había determinado fenoxicarb en trigo (LIU Y COLS., 2008b), 2,4-D y 2,4,5-T en tabaco (LIU Y COLS., 2006) y OPPs en suelo (HUANG Y COLS., 2007). En los dos primeros trabajos, el BGE para la separación consistió en acetato amónico en MeOH/agua y ACN/agua, respectivamente, mientras que en el caso de los OPPs, se emplearon BGEs que contenían aditivos quirales (ciclodextrinas y colato sódico) en mezclas MeOH/ACN/agua.

En algunos casos, NACE se ha utilizado para estudiar de forma teórica los efectos que ejerce el medio no acuoso sobre otros parámetros de la separación empleando diferentes analitos como compuestos modelo (CARABIAS-MARTÍNEZ Y COLS., 1997, 2006a; MENZINGER Y COLS., 2001). Por ejemplo, Carabias-Martínez y cols. (1997) estudiaron la movilidad electroforética de un grupo de triazinas y los valores de pH y pK_a aparentes en mezclas MeOH/ACN, así como el efecto de la adición de diferentes aditivos iónicos al medio de separación. En un segundo trabajo, los mismos autores (CARABIAS-MARTÍNEZ Y COLS., 2006a) estudiaron el comportamiento migratorio de los compuestos basándose en la asociación de pares iónicos y en los equilibrios ácido-base existentes.

Es importante destacar que en varios de los trabajos que hacen uso de NACE para el análisis de plaguicidas, se recomienda el uso de un IS cuando se emplea la inyección electrocinética (CARABIAS-MARTÍNEZ Y COLS., 1997, 1999, 2000, 2002; 2006a, 2006b, 2007; MENZINGER Y COLS., 2001; RODRÍGUEZ-GONZALO Y COLS., 2009). Este tipo de inyección se ve más afectada por las condiciones experimentales que la inyección hidrodinámica y esto puede provocar en algunos casos una baja repetibilidad de la inyección, por lo que es aconsejable trabajar con relaciones de área ($A_{\text{analito}}/A_{\text{IS}}$).

Por otro lado, las propiedades únicas de los CNTs les confieren una capacidad de adsorción altamente selectiva para ciertos analitos y, por lo tanto, se han utilizado como fases estacionarias en SPE (TROJANOWICZ, 2006; PYRZYNSKA, 2011). En este sentido, los MWCNTs habían sido utilizados sólo en pocas ocasiones para la extracción de plaguicidas de muestras de agua y sólo en

combinación con GC o HPLC (ZHOU Y COLS., 2006b, 2007a; WANG Y COLS., 2007; EL-SHEIKH Y COLS., 2007, 2008; MIN Y COLS., 2008; KATSUMATA Y COLS., 2008), mientras que los SWCNTs no habían sido utilizados todavía para este propósito. Ninguno de los plaguicidas de estudio había sido previamente extraído de este tipo de muestras utilizando CNTs. En lo que respecta a su combinación con la CE, sólo se habían empleado en dos ocasiones (SUÁREZ Y COLS., 2007a, 2007b), pero en ningún caso para el análisis de residuos de plaguicidas, sino de antiinflamatorios (SUÁREZ Y COLS., 2007b) y tetraciclinas (SUÁREZ Y COLS., 2007a).

IV.1.2.- SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA MEDIANTE NACE-UV

La Tabla IV.1.1 muestra las estructuras químicas y algunas de las características de los plaguicidas incluidos en el estudio. Hasta el momento, ninguno de los siete plaguicidas del grupo seleccionado (pirimicarb, carbendazima, pirifeno, pirimetanil, ciromazina, ciprodinil y penconazol) había sido previamente analizado, ni simultánea ni individualmente, por NACE.

Se seleccionó la ametrina como IS, ya que su uso está prohibido en la actualidad y, sobre todo, dado que su tiempo de migración era intermedio al del resto de los analitos y posee una estructura y valores de pK_a y de K_{ow} muy parecidos a los de los plaguicidas de estudio ($pK_a = 4,1$, $\log K_{ow} = 2,63$ (FOOTPRINT-IUPAC)).

IV.1.2.1.- OPTIMIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DEL BGE

En NACE, el MeOH, el ACN y las mezclas de ambos han sido frecuentemente empleados como BGEs. Además, el uso de aditivos que puedan formar pares iónicos con los analitos, así como el diferente comportamiento que presentan éstos en disolventes orgánicos con respecto al agua, proporciona una gran versatilidad a este modo de separación.

Los plaguicidas estudiados son bases débiles, con valores de pK_a entre 1,51 y 5,22, con lo que se hace necesario utilizar un BGE que posea un pH aparente (pH^*) bajo para protonarlos. En este sentido, el $HClO_4$ es un ácido fuerte que se encuentra totalmente disociado en ACN (KOLTHOFF Y COLS., 1961) y, por tanto, la reacción entre el protón solvatado del ácido y los analitos (aunque se trate de bases muy débiles) es más completa que en agua (CARABIAS-MARTÍNEZ Y COLS., 1997).

Tabla IV.1.1.- Estructura y propiedades de los plaguicidas de estudio.

| Plaguicida (familia) | Estructura | Actividad | Mw (g/mol) | pK _a ^{a)} | Solubilidad en agua (mg/L, 20 °C) | DT ₅₀ típico (días) | Log K _{ow} | K _{oc} (mL/g) |
|----------------------------------|------------|-------------|------------|-------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|---------------------|------------------------|
| Pirimicarb (carbamato) | | Insecticida | 238,4 | 4,40 | 3100 | 86 | 1,7 | - |
| Pirifenox (piridina) | | Fungicida | 295,2 | 4,61 | 300 | 66 | 3,4 | 980 |
| Penconazol (triazol) | | Fungicida | 284,2 | 1,51 | 73 | 197 | 3,72 | - |
| Carbendazima (carbamato) | | Fungicida | 191,2 | 4,20 | 8 | 40 | 1,48 | - |
| Ciromazina (triazina) | | Insecticida | 166,2 | 5,22 | 13 000 | 93 | 0,069 | - |
| Pirimetanil (anilino pirimidina) | | Fungicida | 199,1 | 3,52 | 121 | 55 | 2,84 | - |
| Ciprodinil (anilino pirimidina) | | Fungicida | 225,3 | 4,44 | 13 | 37 | 4,0 | - |
| Ametrina (IS) (triazina) | | Herbicida | 227,1 | 4,10 | 200 | 37 | 2,63 | 316 |

- Datos no encontrados/No aplicable. Mw: masa molecular. pK_a: constante de disociación ácida. DT₅₀: tiempo de semidesintegración o vida media. K_{ow}: coeficiente de partición octanol/agua. K_{oc}: coeficiente de adsorción de carbono orgánico del suelo (FOOTPRINT, IUPAC). a) Valores de pK_a como bases débiles.

Sin embargo, en ocasiones, a pesar de que la adición de un ácido como el HClO_4 proporciona mejoras sustanciales en la separación, no es suficiente para alcanzar la resolución completa de los analitos dada la similitud química de sus estructuras.

Una característica relevante de los disolventes no acuosos es su baja constante dieléctrica. La intensidad de las interacciones electrostáticas entre iones de signo contrario aumenta a medida que la constante dieléctrica del medio disminuye, lo que afecta directamente a la formación de pares iónicos. En este sentido, el SDS es un tensioactivo aniónico que interacciona con analitos protonados, creando diferencias adicionales en las correspondientes movilidades electroforéticas (CARABIAS-MARTÍNEZ Y COLS., 1997).

En base a lo anterior, la composición del BGE empleado en los experimentos preliminares consistió en mezclas que contenían HClO_4 y SDS en MeOH puro, disolvente prótico capaz de actuar como dador y aceptor de protones. La elección de la composición más adecuada del BGE se llevó a cabo paso a paso, aplicando un voltaje de +22 kV y manteniendo la temperatura del capilar constante a 25 °C. La detección se realizó a 214 nm.

En cuanto a la inyección electrocinética de la muestra, como punto de partida se seleccionó como medio de la muestra MeOH/ACN conteniendo una pequeña concentración de HClO_4 . Esta composición había sido frecuentemente utilizada en trabajos previos para la determinación de analitos similares a los del presente trabajo (CARABIAS-MARTÍNEZ Y COLS., 1999, 2000, 2002, 2006a, 2006b, 2007; RODRÍGUEZ-GONZALO Y COLS., 2009). Tras realizar algunas experiencias preliminares, la inyección se realizó inicialmente a +10 kV durante 4 s, utilizando 78:22 (v/v) ACN/MeOH conteniendo 1,11 mM HClO_4 como medio de la muestra. No obstante, estas condiciones fueron posteriormente optimizadas (sección IV.1.2.2).

En primer lugar, se estudió el efecto de la variación de la concentración de SDS entre 10 y 90 mM, manteniendo la concentración de HClO_4 constante a 7,5 mM en MeOH puro. Como muestra la Figura IV.1.1, un aumento gradual de la concentración de SDS proporcionó una mejor resolución, debido al aumento de la formación de pares iónicos de los analitos con el anión dodecilsulfato, así como por el aumento de la fuerza iónica. La ausencia de SDS o el empleo de

concentraciones bajas, no permitía la separación completa. Por el contrario, una concentración demasiado elevada de SDS (90 mM) aumentaba innecesariamente los tiempos de análisis. Por tanto, se seleccionó una concentración de 70 mM de SDS, al proporcionar una buena separación de todos los compuestos en menos de 17 min.

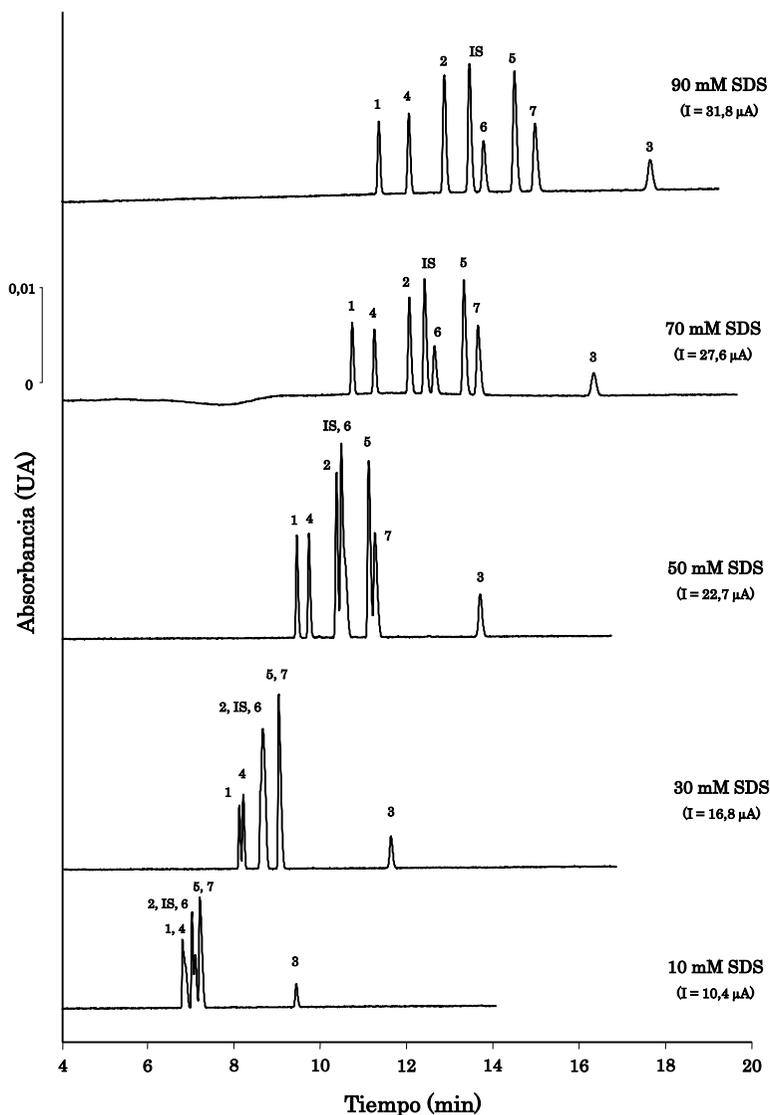


Figura IV.1.1.- Influencia de la concentración de SDS en el BGE (7,5 mM de HClO_4 en 100% MeOH). Voltaje: +22 kV. Temperatura: 25 °C. Detección UV: 214 nm. Inyección electrocinética: +10 kV, 4 s. Muestra: 5 mg/L de cada plaguicida y de IS en una mezcla 78:22 (v/v) ACN/MeOH conteniendo 1,11 mM HClO_4 . (1) Pirimicarb, (2) pirifenox, (3) penconazol, (4) carbendazima, (5) ciromazina, (6) pirimetanil y (7) ciprodinil.

En la separación electroforética de analitos ionizables, el valor del pH^* del medio juega un papel fundamental, ya que determina el grado de ionización de cada compuesto además de la magnitud del EOF. Con el objetivo de comprobar el efecto que la fuerza iónica y el pH^* producían en la separación, así como de asegurar la protonación completa de todos los analitos, se varió la concentración de HClO_4 entre 1,5 y 10,5 mM, manteniendo la concentración de SDS constante a 70 mM (Figura IV.1.2).

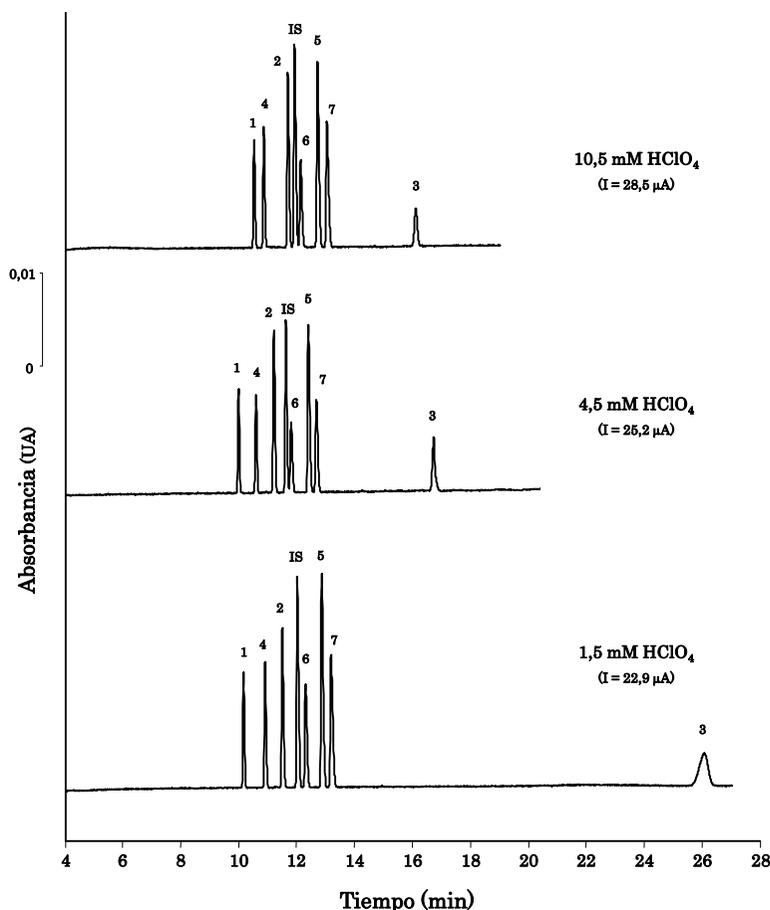


Figura IV.1.2.- Influencia de la concentración de HClO_4 en el BGE (70 mM de SDS en 100% MeOH). Resto de las condiciones análogas a las de la Figura IV.1.1. (1) Pirimicarb, (2) pirifenox, (3) penconazol, (4) carbendazima, (5) ciromazina, (6) pirimetanil y (7) ciprodinil.

A valores de pH^* suficientemente ácidos, las movilidades de los analitos tienden a un valor máximo constante, lo que indica que se encuentran totalmente protonados. Como muestra la figura, esto se cumple para todos los

plaguicidas a partir de la adición de una concentración de HClO_4 de 1,5 mM, excepto para el penconazol, que necesita al menos una concentración de 4,5 mM para asegurar su protonación completa, ya que posee el menor valor de pK_a (1,51) de todos los plaguicidas estudiados.

El efecto de la adición de ACN se estudió preparando diferentes BGEs basados en mezclas MeOH/ACN de diferente composición conteniendo 10,5 mM de HClO_4 y 70 mM de SDS.

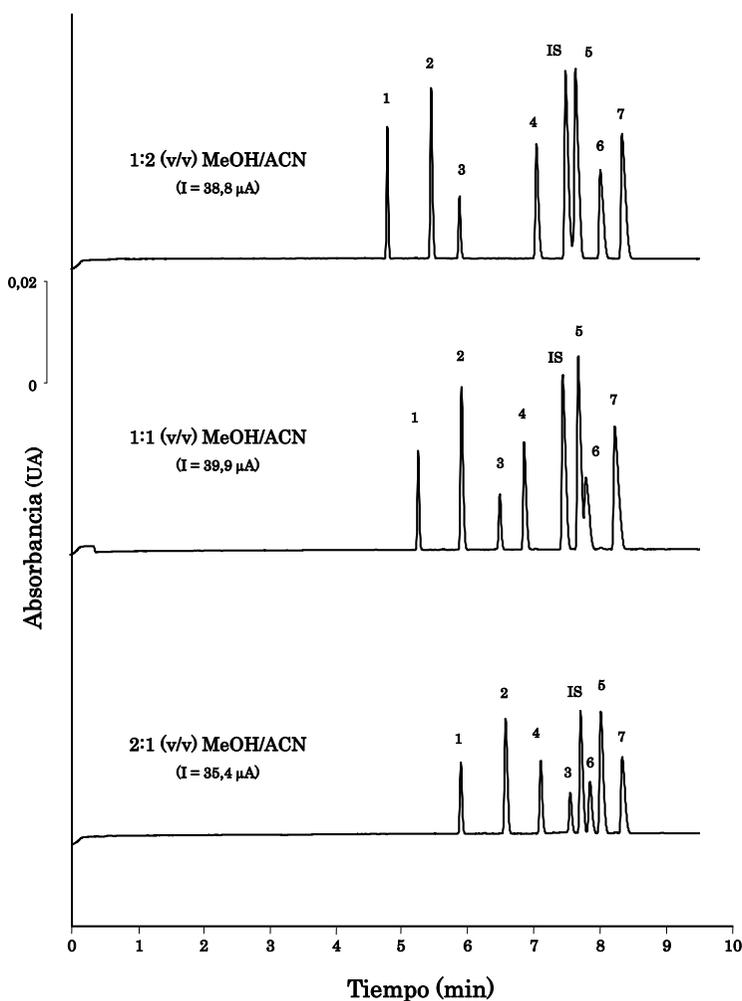


Figura IV.1.3.- Influencia de la adición de ACN al BGE (70 mM de SDS, 10,5 mM HClO_4). Resto de las condiciones análogas a las de la Figura IV.1.1. (1) Pirimicarb, (2) pirifenox, (3) penconazol, (4) carbendazima, (5) cioramazina, (6) pirimetanil y (7) ciprodinil.

Como se puede observar en la Figura IV.1.3, la presencia de este segundo

disolvente en distintas proporciones redujo significativamente el tiempo de análisis y también alteró el orden de elución de los plaguicidas, afectando por tanto a la selectividad. Por otra parte, también se puede observar que la presencia de ACN en el BGE produjo un aumento de la sensibilidad al utilizar la inyección electrocinética, tal como indican algunos trabajos ya publicados (HERNÁNDEZ-BORGES Y COLS., 2005).

Aunque la mezcla 2:1 (v/v) MeOH/ACN proporcionaba una separación completa con tiempos de análisis próximos a 8,5 min, la mejor resolución para la mayor parte de los plaguicidas se obtuvo utilizando la mezcla 1:2 (v/v) MeOH/ACN. Se obtuvieron tiempos de análisis inferiores a 9 min, casi 8 menos que en ausencia de ACN, con una buena resolución de todos los picos, a excepción de la correspondiente al IS y a la ciromazina.

Con el objetivo de mejorar la resolución entre el IS y la ciromazina se modificó ligeramente tanto la concentración de SDS (entre 70 y 80 mM) como la de HClO₄ (entre 10,5 y 20,5 mM). Una concentración de 20,5 mM de HClO₄ proporcionó una resolución completa en 9,5 min. Por su parte, el aumento de la concentración de SDS permitió también obtener una resolución completa, pero con tiempos de análisis muy superiores. Por lo tanto, se seleccionó como óptimo el BGE preparado a partir de una mezcla 1:2 (v/v) MeOH/ACN con un 70 mM de SDS y un 20,5 mM de HClO₄.

IV.1.2.2.- OPTIMIZACIÓN DE LA INYECCIÓN ELECTROCINÉTICA

Como ya se señaló en el Capítulo I, uno de los procedimientos de preconcentración en línea más utilizados en CE es la inyección electrocinética utilizando una muestra con una conductividad inferior a la del BGE (FASS). Dado que los valores de pK_a de los plaguicidas seleccionados se encuentran entre 1,51 y 5,22, la matriz de la muestra no sólo debe poseer una baja conductividad, sino también proporcionar una ionización, en este caso protonación, adecuada de los solutos.

Por tanto, se optimizó la conductividad de la muestra, así como el tiempo y el voltaje de la inyección. Para ello, se inyectaron diferentes disoluciones de los plaguicidas que contenían HClO₄ en ACN, MeOH o mezclas de ambos, incluyendo el propio BGE sin SDS. Los mejores resultados en cuanto a

sensibilidad se obtuvieron empleando una concentración 1,11 mM de HClO_4 en una mezcla 78:22 (v/v) ACN/MeOH. Por otra parte, el tiempo de inyección se varió entre 4 y 15 s y el voltaje entre +5 y +12 kV, siendo 12 s y +10 kV, respectivamente, los valores que proporcionaron los mejores resultados. Al utilizar tiempos de inyección más elevados se producían frecuentes caídas de corriente, lo que no permitía llevar a cabo la separación.

IV.1.2.3.- SELECCIÓN DE LA TEMPERATURA DE TRABAJO Y DEL VOLTAJE APLICADO

Aunque en NACE el efecto del EOF se puede considerar en muchos casos despreciable, se debe tener en cuenta que la movilidad del mismo depende también de la temperatura de trabajo. Es por ello que se estudió la influencia de la temperatura entre 20 y 30 °C, observando que la obtención de los menores tiempos de análisis, alta resolución y adecuada eficacia de pico tenía lugar a 25 °C, que fue la temperatura seleccionada en los experimentos preliminares. Asimismo, se observó que se obtenían mejores resultados en cuestión de repetibilidad al mantener la muestra a 10 °C previamente a su inyección.

Por otra parte, tras aplicar diferentes voltajes de separación entre +18 y +25 kV en modo normal, se llegó a la conclusión de que la mejor eficacia, resolución y tiempo de análisis se obtenía a +22 kV, que fue el voltaje seleccionado para llevar a cabo los experimentos iniciales.

La Figura IV.1.4 muestra el electroferograma correspondiente a la separación de los plaguicidas seleccionados en las condiciones óptimas obtenidas. Los LODs alcanzados oscilaron entre 8,80 y 26,2 $\mu\text{g/L}$.

IV.1.3.- OPTIMIZACIÓN DEL PROCEDIMIENTO DE SPE UTILIZANDO MWCNTS

Con el objeto de extraer los siete plaguicidas en estudio de muestras de agua y dado el reciente interés que habían suscitado los CNTs como fases estacionarias en procedimientos de extracción en las últimas décadas (ver Capítulo I), se procedió a optimizar un procedimiento de SPE que incluyera el uso de estas nuevas fases estacionarias.

Con respecto a las familias a las que pertenecen los plaguicidas seleccionados, sólo se habían extraído algunas triazinas de aguas haciendo uso

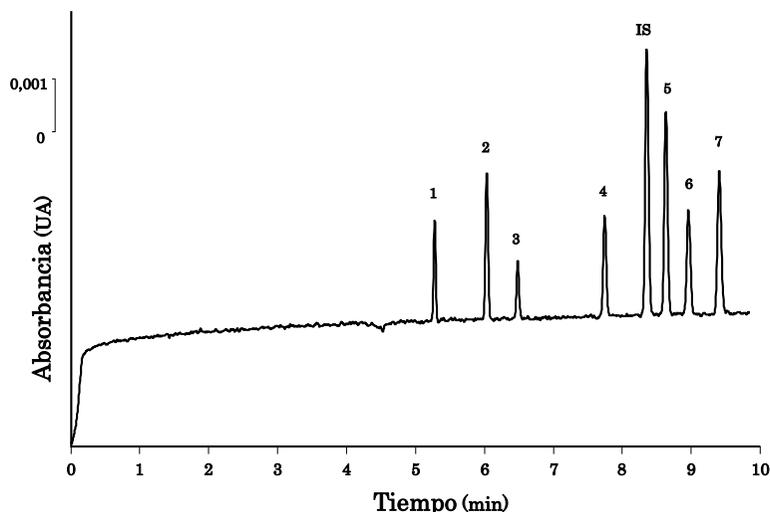


Figura IV.1.4.- Electroferograma de la separación óptima. BGE: 20,5 mM de HClO_4 , 70 mM SDS en 1:2 (v/v) MeOH/ACN. Voltaje: +22 kV. Temperatura del capilar: 25 °C. Temperatura de la muestra: 10 °C. Detección UV: 214 nm. Inyección electrocinética +10 kV, 12 s. Muestra: 5 mg/L de cada plaguicida y de IS en una mezcla 78:22 (v/v) de ACN/MeOH conteniendo 1,11 mM HClO_4 . (1) Pirimicarb, (2) pirifenox, (3) penconazol, (4) carbendazima, (5) ciromazina, (6) pirimetanil y (7) ciprodinil.

de MWCNTs, principalmente atrazina (ZHOU Y COLS., 2006d; EL-SHEIKH Y COLS., 2007, 2008; MIN Y COLS., 2008; AL-DEGS Y AL-GHOUTI, 2008; AL-DEGS Y COLS., 2009; LÓPEZ-FERIA Y COLS., 2009), simazina (ZHOU Y COLS., 2006d; AL-DEGS Y AL-GHOUTI, 2008) y en otros casos cianazina (ZHOU Y COLS., 2007a), prometrina (ZHOU Y COLS., 2007b; WANG Y COLS., 2007), deisopropil-atrazina y dietil-atrazina (MIN Y COLS., 2008). Sin embargo, hasta el momento, ninguno de los plaguicidas de estudio había sido previamente extraído de este tipo de muestras utilizando CNTs.

Por otra parte, los MWCNTs más empleados hasta el momento poseían un d.e. entre 30-60 nm (ZHOU Y COLS., 2006a, 2006b, 2006c, 2006d, 2007a, 2007b, 2007c, 2008b) y 40-60 nm (EL-SHEIKH Y COLS., 2007, 2008; WANG Y COLS., 2007; MIN Y COLS., 2008; AL-DEGS Y AL-GHOUTI, 2008; AL-DEGS Y COLS., 2009) y en pocas ocasiones se habían utilizado MWCNTs con otras dimensiones, como 3-10 nm (KATSUMATA Y COLS., 2008), 5-10 nm (BIESAGA Y PYRZYNSKA, 2006) o 10-20 nm (EL-SHEIKH Y COLS., 2007). En el presente estudio, se utilizaron MWCNTs de 10-15 nm de d.e., 2-6 nm de d.i. y 0,1-10 μm de longitud, que no habían sido empleados previamente para la extracción de plaguicidas. Además, este tipo de MWCNTs es más económico que los de mayor d.e. (30-60 y 40-60 nm), permitiendo incluso un gasto por extracción mucho menor que cuando se utilizan cartuchos convencionales.

Como en todo procedimiento de SPE, son diversos los parámetros que hay que optimizar: cantidad de fase estacionaria, pH y volumen de la muestra y tipo y volumen de disolvente de elución. El protocolo de activación también es fundamental. En este sentido, tras ensayar diversos tipos de activación, finalmente ésta se llevó a cabo con 10 mL de ACN y 10 mL de agua Milli-Q. Para la optimización de las condiciones de SPE también se utilizó agua Milli-Q. En este punto es de resaltar que los electroferogramas obtenidos tras la aplicación del procedimiento SPE a estas muestras de agua fueron prácticamente iguales a los obtenidos cuando se inyectaba la mezcla de los estándares.

IV.1.3.1.- SELECCIÓN DEL DISOLVENTE DE ELUCIÓN

Los primeros experimentos se desarrollaron utilizando 40 mg de MWCNTs y 100 mL de agua Milli-Q a pH 6,0 y variando el tipo de disolvente empleado durante la etapa de elución. Inicialmente, se seleccionó un pH de 6,0 ya que, en estas condiciones, los analitos se encuentran en estado neutro y, por lo tanto, a priori y dada la naturaleza apolar de la fase estacionaria, cabría esperar que los plaguicidas fueran más retenidos por los CNTs. Se estudiaron cinco disolventes puros de diferente polaridad (ACN, MeOH, DCM, acetona, *n*-hexano y acetato de etilo) en distintas cantidades (entre 5 y 30 mL). De estos experimentos preliminares se dedujo que los porcentajes de recuperación más elevados se obtenían al emplear ACN (entre 39 y 75%), a pesar de que no se extraía ni el pirimetanil ni el ciprodinil y, por otra parte, DCM (entre 16 y 80%), aunque en este caso no se extraía la ciromazina. La carbendazima no se extraía con ninguno de los disolventes probados.

Por esta razón, a continuación se eluyó con ACN y DCM de forma sucesiva y con mezclas de ellos. Los mejores resultados se obtuvieron cuando se realizó la elución con 10 mL de ACN y 20 mL de DCM de forma consecutiva, combinación mediante la cual se conseguían eluir todos los plaguicidas, incluyendo pirimetanil, ciprodinil, ciromazina y carbendazima. Se obtuvieron porcentajes de recuperación entre 42 y 80% para todos los plaguicidas, excepto para la carbendazima y la ciromazina, para las que se obtenían recuperaciones bajas, de 3 y 11% respectivamente (ver Figura IV.1.5).

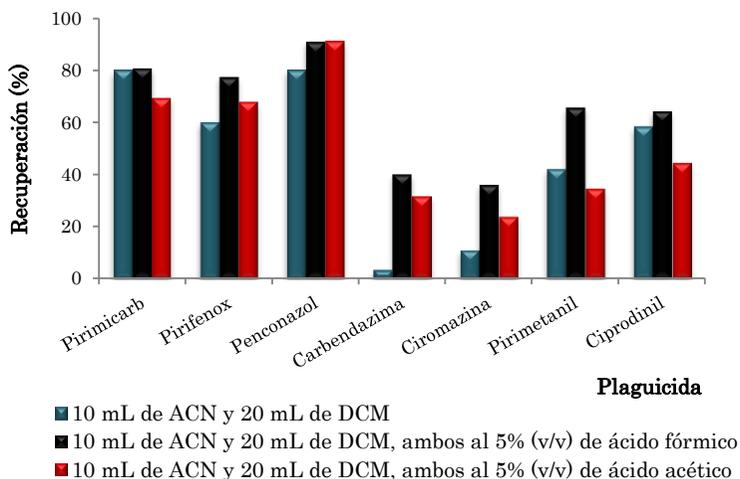


Figura IV.1.5.- Efecto de la adición de los ácidos acético y fórmico a los disolventes de elución. Concentración: 5 mg/L. Volumen de muestra: 100 mL. pH de la muestra: 6,0. Cantidad de MWCNTs: 40 mg.

Con el objetivo de mejorar la extracción, se estudió la inclusión de diversos aditivos ácidos (ácido fórmico, ácido acético, HCl y HClO₄) en el disolvente de elución en porcentajes de hasta un 10% (v/v). Con ello se pretendía protonar los analitos y producir así un cambio en su forma química que pudiera mejorar la elución. La adición de los ácidos acético y fórmico proporcionó una mejoría notable para todos los plaguicidas, incluso para la carbendazima y la ciromazina. Tal como se puede observar en la Figura IV.1.5, utilizando ácido fórmico como aditivo se obtenían mejores resultados. Además, la adición de más de un 5% (v/v) no implicó mejoras sustanciales. Por lo tanto, las condiciones óptimas de elución implicaron el uso de 10 mL de ACN y 20 mL de DCM ambos al 5% (v/v) de ácido fórmico, obteniendo porcentajes de recuperación entre 36 y 91%.

IV.1.3.2.- SELECCIÓN DE LA CANTIDAD DE MWCNTS

A continuación, se comprobó el efecto de la cantidad de MWCNTs introducida en el cartucho (entre 30-50 mg) con el objetivo de emplear la menor cantidad posible pero manteniendo, al mismo tiempo, altos porcentajes de recuperación. El uso de estas bajas cantidades ya había sido sugerido con anterioridad en la bibliografía (KATSUMATA Y COLS., 2008). En la Figura IV.1.6 se muestran los resultados obtenidos en este aspecto, donde se puede apreciar que

el uso de 30 mg proporcionó porcentajes de recuperación más bajos para pirimicarb, pirifenox, penconazol y ciromazina, mientras que cuando se empleaban 50 y 40 mg las diferencias en los porcentajes de recuperación no eran demasiado considerables, excepto para penconazol y ciromazina, cuyos porcentajes de recuperación eran más elevados al utilizar 40 mg.

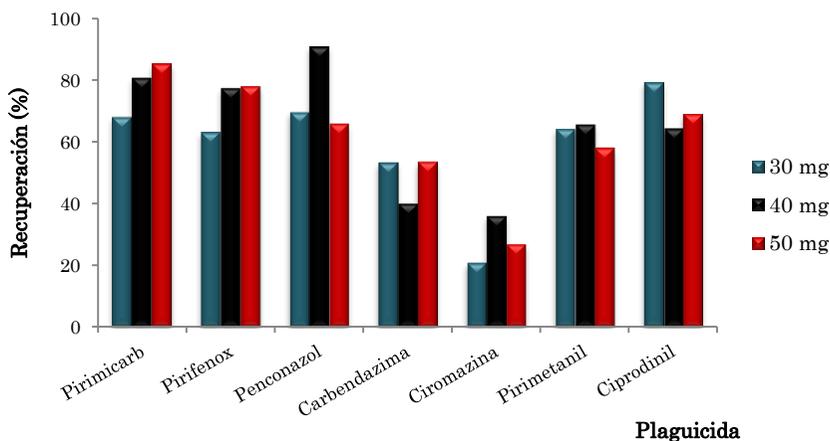


Figura IV.1.6.- Efecto de la cantidad de MWCNTs empleada para empaquetar las columnas de SPE. Secuencia de elución: 10 mL de ACN y 20 mL DCM, ambos al 5% (v/v) de ácido fórmico. Resto de las condiciones iguales a las de la Figura IV.1.5.

Por tanto, se seleccionó esta última cantidad como la más adecuada, que a su vez había sido la seleccionada para realizar los experimentos preliminares.

IV.1.3.3.- SELECCIÓN DEL pH DE LA MUESTRA

El pH de la muestra juega un papel importante en la retención de los plaguicidas en la fase estacionaria, ya que va a determinar si los analitos en disolución se encuentran como moléculas neutras o como iones (FRITZ, 1999). Para comprobar su efecto, se realizaron experimentos en las condiciones anteriores, pero variando el pH entre 6 y 9, ya que valores inferiores a 6 proporcionaban porcentajes de recuperación más bajos. Como se puede observar en la Figura IV.1.7, la extracción resultó ser más efectiva a pH 8,0, obteniendo porcentajes de recuperación que variaron entre 68 y 102%, excepto para la carbendazima, para la que se obtuvo un 49%. Para los valores de pH superiores a 9,0 los porcentajes de recuperación fueron mucho más bajos para plaguicidas como ciromazina, pirimetanil y ciprodinil (5-35%).

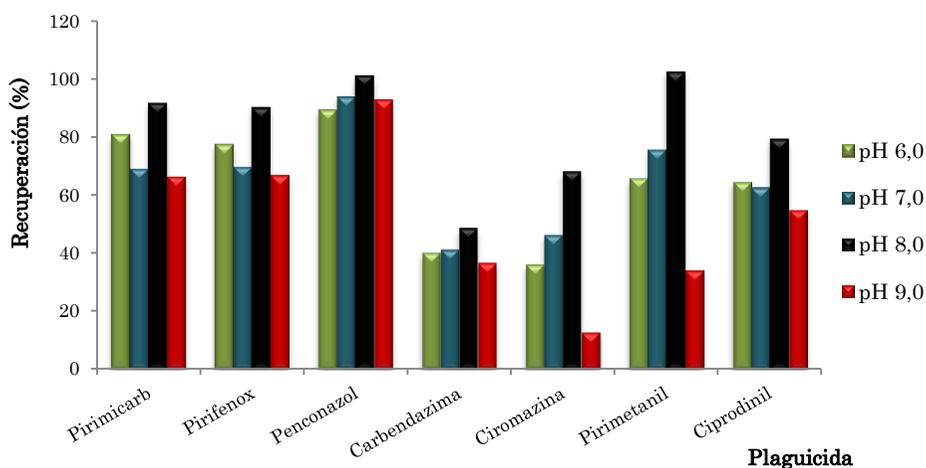


Figura IV.1.7.- Efecto del pH sobre la retención de los plaguicidas por las columnas de 40 mg de MWCNTs. Resto de las condiciones iguales a las de la Figura IV.1.6.

Una vez obtenidas las mejores condiciones, se modificó ligeramente cada uno de los factores con objeto de mejorar los porcentajes de recuperación obtenidos, sobre todo para la carbendazima y la ciromazina, sin éxito alguno. Posiblemente, dichos valores se deben a una retención incompleta de estos dos plaguicidas en la fase estacionaria y no a una elución parcial de los mismos.

Por tanto, las condiciones óptimas para el proceso de SPE fueron las siguientes: activación con 10 mL de ACN y 10 mL de agua Milli-Q, muestra a un pH de 8,0, 40 mg de MWCNTs, y elución con 10 mL de ACN y 20 mL de DCM, ambos al 5% (v/v) en ácido fórmico.

IV.1.4.- APLICACIÓN DEL PROCEDIMIENTO DE SPE AL ANÁLISIS DE AGUA MINERAL

Posteriormente, se aplicó la metodología desarrollada para la extracción de los plaguicidas seleccionados de muestras de agua mineral. Se seleccionó un tipo de agua mineral natural de mineralización débil, indicada para la preparación de alimentos infantiles debido a su bajo contenido en flúor y sodio. Además, era un agua poco carbonatada, débilmente alcalina y con un bajo contenido en calcio. Poseía una conductividad de 172 $\mu\text{S}/\text{cm}$ y un pH de 7,2.

Con el objetivo de mejorar los LODs del método, se aumentó el volumen de muestra. Sólo hasta un máximo de 750 mL se obtenían los porcentajes de

recuperación más altos, ya que al utilizar volúmenes mayores se obtenían recuperaciones anormalmente bajas (<70%) debidas, posiblemente, a una retención incompleta de los mismos por parte de los CNTs. Sin embargo, fue necesario modificar ligeramente la composición del BGE debido al solapamiento de dos de los plaguicidas con una interferencia procedente de la muestra.

En la Figura IV.1.8 se muestran los electroferogramas obtenidos al aplicar la metodología desarrollada anteriormente a una muestra de agua mineral enriquecida empleando el BGE ya optimizado (70 mM SDS, 20,5 mM HClO₄ en 1:2 (v/v) MeOH/ACN), y no enriquecida bajo las mismas condiciones experimentales. Como se puede observar, se trata de una muestra con una matriz más compleja que la del agua Milli-Q y tanto el penconazol como el pirimetanil se solapaban con interferencias procedentes de la propia matriz de la muestra (*), posiblemente debido a la presencia de sales que eran retenidas y eluidas en el proceso de SPE. Con objeto de resolver las interferencias de los picos de interés, y dada la tendencia que se observó al variar la concentración de SDS en los experimentos preliminares, se aumentó la concentración de este aditivo a 90 mM. De esta forma, se obtuvo una separación completa de los plaguicidas y de las interferencias, aunque se produjo, como era de esperar, un ligero incremento en el tiempo de análisis.

IV.1.4.1.- VALIDACIÓN DEL MÉTODO

IV.1.4.1.1.- ESTUDIO DE REPETIBILIDAD Y CALIBRADO INSTRUMENTAL

Tras la selección del BGE más adecuado para el análisis de la muestra de interés (90 mM SDS, 20,5 mM HClO₄ en 1:2 (v/v) MeOH/ACN) se llevó a cabo el calibrado instrumental y un estudio de repetibilidad de la metodología MWCNTs-SPE-NACE-UV desarrollada.

El estudio de repetibilidad se realizó inyectando tres niveles de concentración cuatro veces consecutivas en el mismo día ($n = 4$) durante nueve días diferentes ($n = 36$). También se llevó a cabo un estudio de repetibilidad con cuatro capilares diferentes inyectando tres veces consecutivas ($n = 3$) el nivel intermedio durante cuatro días distintos para cada capilar ($n = 12$). Se optó por realizar estos estudios con capilares diferentes, dado que los disolventes orgánicos

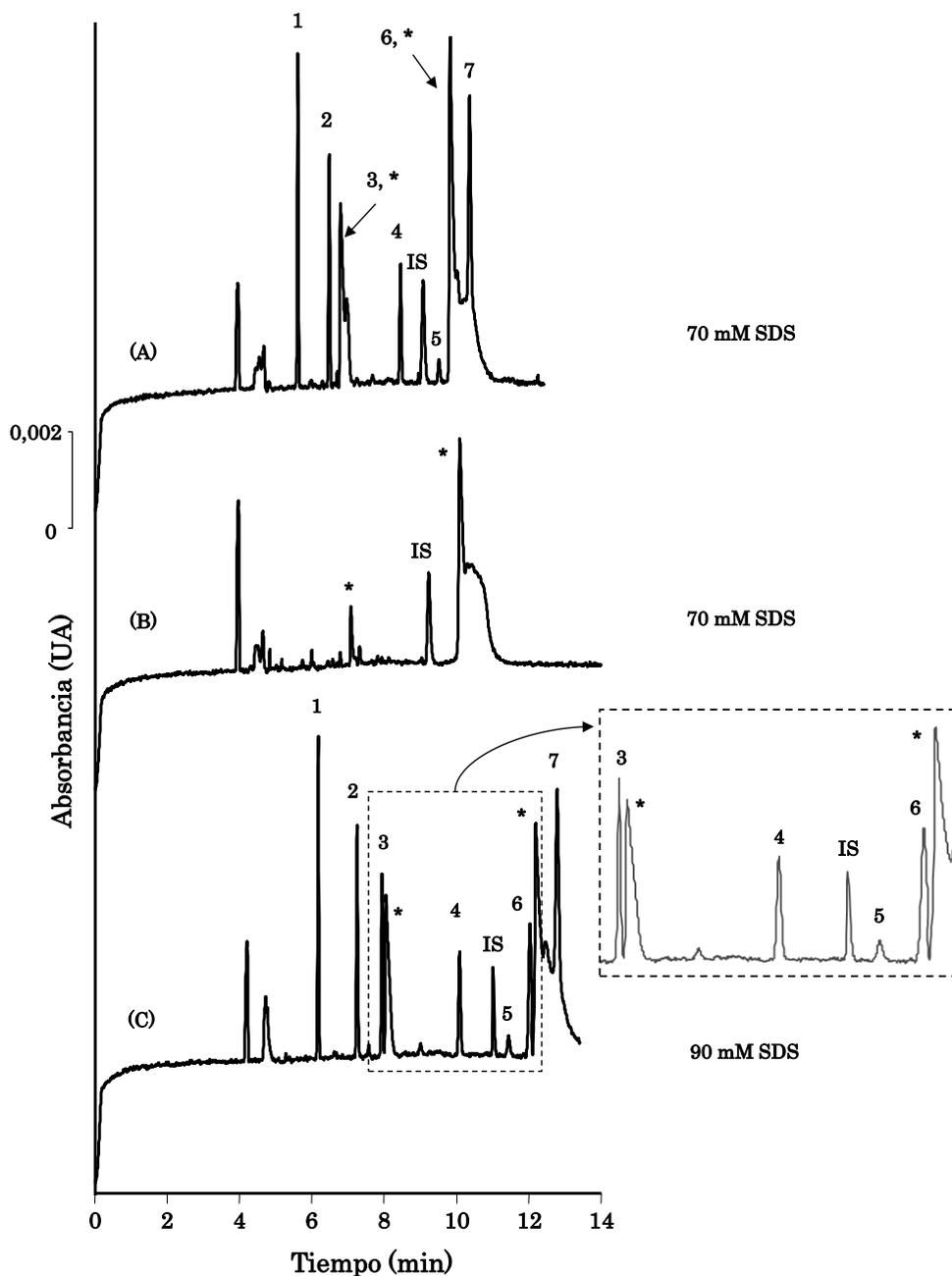


Figura IV.1.8.- Electroferogramas de una muestra de agua mineral (750 mL) previamente sometida al procedimiento SPE-NACE-UV, (A) y (C) enriquecida con 0,7 $\mu\text{g/L}$ de cada plaguicida y (B) sin enriquecer. BGE: 20,5 mM HClO_4 en 1:2 (v/v) MeOH/ACN. Concentración del IS: 0,3 $\mu\text{g/L}$. Resto de las condiciones análogas a las de la Figura IV.1.4. (1) Pirimicarb, (2) pirifenox, (3) penconazol, (4) carbendazima, (5) ciormazina, (6) pirimetanil y (7) ciprodinil.

utilizados en NACE hacen que los cambios de capilar sean más frecuentes que en otros modos de CE. La Tabla IV.1.2 muestra los resultados de este estudio, incluyendo los valores de desviación estándar relativa (RSD) obtenidos para los tiempos de migración y la relación de áreas para el nivel de concentración intermedio, ya que se obtuvieron valores similares para los otros dos niveles.

Tabla IV.1.2.- Estudio de repetibilidad (empleando el mismo y distintos capilares) del método NACE-UV desarrollado.

| Plaguicida | Precisión en el mismo día ($n = 4$) | | | Precisión entre días ($n = 36$, nueve días) | | | Repetibilidad entre capilares ($n = 12$, cuatro capilares) | |
|--------------|---------------------------------------|---------------|-------------------------------|---|---------------|-------------------------------|--|-------------------------------|
| | t_m (RSD, %) | A (RSD, %) | A/A _{IS} (RSD, %) | t_m (RSD, %) | A (RSD, %) | A/A _{IS} (RSD, %) | t_m (RSD, %) | A/A _{IS} (RSD, %) |
| Pirimicarb | 0,5 | 8,8 | 1,2 | 1,7 | 12,2 | 7,1 | 1,8 | 7,2 |
| Pirifenox | 0,5 | 10,1 | 0,9 | 2,3 | 11,8 | 7,2 | 2,1 | 8,4 |
| Penconazol | 0,6 | 14,0 | 0,8 | 2,3 | 15,2 | 9,3 | 2,3 | 7,3 |
| Carbendazima | 0,9 | 10,0 | 0,8 | 3,0 | 9,6 | 6,2 | 3,0 | 9,4 |
| Ciromazina | 1,0 | 8,2 | 0,5 | 3,3 | 10,8 | 4,0 | 3,4 | 7,4 |
| Pirimetanil | 1,0 | 9,6 | 0,6 | 3,5 | 10,6 | 5,5 | 3,9 | 8,7 |
| Ciprodinil | 1,1 | 10,1 | 0,9 | 3,5 | 9,7 | 4,6 | 4,2 | 4,2 |

Los valores de RSD obtenidos para la relación A/A_{IS} fueron mucho menores que los obtenidos para las áreas. Así, dentro de un mismo día se obtuvieron valores entre 8,2 y 14,0% para las áreas de pico y entre 0,5 y 1,2% para la relación A/A_{IS}, mientras que para días diferentes se obtuvieron porcentajes entre 9,6 y 15,2% para las áreas y entre 4,0 y 9,3% para su relación. En cuanto a los tiempos de migración, se obtuvieron valores de RSD inferiores al 1,1% en el mismo día y menores de 3,5% para días distintos. Por otra parte, respecto al estudio realizado con cuatro capilares distintos, muy poco común en la bibliografía, los valores de RSD para los tiempos fueron menores de 4,2% y menores de 9,4% para la relación de áreas, lo que demuestra la buena repetibilidad del método incluso con capilares diferentes.

A continuación, se realizó un calibrado basado en las relaciones de área de cada plaguicida para llevar a cabo el análisis cuantitativo. Para ello, se

inyectaron por quintuplicado siete disoluciones de diferente concentración ($n = 7$) de la mezcla de los analitos. La Tabla IV.1.3 muestra la pendiente y ordenada en el origen con sus intervalos de confianza, los coeficientes de determinación (R^2) y los LODs. Estos últimos y los LOQs se calcularon como la concentración de soluto capaz de proporcionar una relación S/N de 3 y 10, respectivamente. Además, para comprobar su validez, se inyectaron repetidas veces disoluciones de los plaguicidas de estudio de concentraciones equivalentes a sus LODs y LOQs, verificando el valor de la relación S/N en cada caso.

Tabla IV.1.3.- Datos de calibración del método NACE-UV desarrollado.

| Plaguicida | Rango lineal (mg/L) | $b \pm t S_b$ | $a \pm t S_a$ | R^2 | LOD ^a (µg/L) |
|--------------|---------------------|-------------------|--------------------|-------|-------------------------|
| Pirimicarb | 0,136-1,36 | $2,40 \pm 0,09$ | $-0,052 \pm 0,067$ | 0,999 | 16,8 |
| Pirifenox | 0,171-1,71 | $1,43 \pm 0,06$ | $-0,032 \pm 0,055$ | 0,999 | 19,6 |
| Penconazol | 0,152-1,52 | $0,842 \pm 0,097$ | $0,084 \pm 0,086$ | 0,988 | 25,6 |
| Carbendazima | 0,163-1,63 | $1,54 \pm 0,09$ | $-0,048 \pm 0,083$ | 0,997 | 11,4 |
| Ciromazina | 0,150-1,50 | $4,94 \pm 0,13$ | $-0,051 \pm 0,117$ | 0,999 | 8,80 |
| Pirimetanil | 0,135-1,35 | $2,57 \pm 0,06$ | $0,041 \pm 0,045$ | 0,999 | 20,7 |
| Ciprodinil | 0,136-1,36 | $3,24 \pm 0,03$ | $-0,066 \pm 0,027$ | 0,999 | 26,2 |

a) Calculado como la concentración capaz de proporcionar una relación S/N de 3. 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^2 : coeficiente de determinación ($n = 7$).

IV.1.4.1.2.- ESTUDIO DE RECUPERACIONES

Por último, se llevó a cabo un estudio de recuperaciones, realizando tres extracciones consecutivas de agua Milli-Q enriquecida a un nivel de concentración ($n = 3$, 100 mL) y cinco de agua mineral enriquecida a tres niveles de concentración diferentes ($n = 5$, 750 mL). La Tabla IV.1.4 muestra los porcentajes de recuperación promedio (% R), los correspondientes valores de RSD, así como los niveles de concentración estudiados para cada tipo de agua.

Para al agua Milli-Q, se obtuvieron porcentajes de recuperación entre 53 y 94% con valores de RSD inferiores al 12%. Los porcentajes de recuperación menores correspondieron a la carbendazima (53%) y a la ciromazina (57%), lo que demuestra, tal como se comentó anteriormente, que estos plaguicidas no fueron completamente retenidos por los CNTs.

Tabla IV.4.- Porcentajes de recuperación (% R), valores de RSD y concentración (Conc.) de plaguicida añadida al agua tras aplicar el método SPE-NACE-UV.

| Plaguicida | Agua Milli-Q | | Agua mineral | | | | | | LOD (µg/L) |
|--------------|-------------------------------|-----------------|-------------------------------|-----------------|-------------------------------|-----------------|-------------------------------|-----------------|---------------|
| | Nivel 1 | | Nivel 1 | | Nivel 2 | | Nivel 3 | | |
| | % R ^{a)} (RSD, %) | Conc. (µg/L) | % R ^{b)} (RSD, %) | Conc. (µg/L) | % R ^{b)} (RSD, %) | Conc. (µg/L) | % R ^{b)} (RSD, %) | Conc. (µg/L) | |
| Pirimicarb | 82 (5) | 4,77 | 78 (7) | 0,159 | 92 (12) | 0,318 | 79 (7) | 0,636 | 0,027 |
| Pirifenox | 81 (5) | 5,69 | 85 (14) | 0,190 | 88 (11) | 0,379 | 78 (6) | 0,758 | 0,031 |
| Penconazol | 94 (6) | 5,05 | 61 (6) | 0,168 | 67 (13) | 0,337 | 66 (12) | 0,673 | 0,058 |
| Carbendazima | 53 (12) | 5,45 | 56 (14) | 0,182 | 59 (13) | 0,363 | 49 (6) | 0,727 | 0,028 |
| Ciromazina | 57 (2) | 5,01 | - | - | - | - | - | - | - |
| Pirimetamil | 74 (4) | 4,50 | 65 (8) | 0,150 | 76 (16) | 0,300 | 74 (8) | 0,601 | 0,039 |
| Ciprodinil | 75 (9) | 6,01 | 70 (2) | 0,200 | 93 (13) | 0,400 | 85 (13) | 0,801 | 0,043 |

a) Media de tres extracciones ($n = 3$), 100 mL de agua Milli-Q. b) Media de cinco extracciones ($n = 5$), 750 mL agua mineral.

Para el agua mineral, se obtuvieron valores de recuperación entre 47 y 93%, algo menores por tratarse de una muestra más compleja que el agua Milli-Q y con valores de RSD inferiores al 16%. Para la ciromazina, se obtuvieron recuperaciones muy bajas (<20%) debido posiblemente a un fuerte efecto matriz, por lo que no se pudo llevar a cabo una cuantificación fiable de este compuesto. Sin embargo, los seis plaguicidas restantes pudieron ser perfectamente cuantificados, obteniendo LODs del método entre 0,027 y 0,058 $\mu\text{g/L}$, notablemente inferiores a los LMRs establecidos para aguas por la UE (0,1 $\mu\text{g/L}$ para un solo plaguicida y 0,5 $\mu\text{g/L}$ para el contenido total de los mismos), lo que demuestra la validez del método propuesto.

IV.1.5.- CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en esta sección, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- Se optimizó la separación electroforética de un grupo de siete plaguicidas (pirimicarb, pirifeno, penconazol, carbendazima, pirimetanil, ciromazina y ciprodinil) empleando NACE con detección UV. El BGE utilizado (90 mM SDS, 20,5 mM HClO_4 en una mezcla 1:1 (v/v) MeOH/ACN) permitió una buena separación de los plaguicidas de estudio, incluyendo el IS (ametrina), en menos de 13 min.
- El uso de la técnica de preconcentración en línea FASS, permitió alcanzar LODs instrumentales comprendidos entre 8,80 y 26,2 $\mu\text{g/L}$, que son valores mucho más bajos que los que frecuentemente se obtienen en CE con detección UV-Vis.
- Se optimizó un procedimiento de SPE, empleando MWCNTs como nuevos materiales de extracción, obteniendo porcentajes de recuperación entre 53 y 94% para agua Milli-Q, y entre 47 y 94% para el análisis de agua mineral excepto para la ciromazina que no pudo ser cuantificada en este último tipo de muestras. Los LODs del método se encuentran entre 0,027 y 0,058 $\mu\text{g/L}$.
- La combinación de ambas técnicas de preconcentración (FASS y SPE) permitió la determinación de estos plaguicidas en agua mineral a niveles por debajo de los límites legales permitidos para este tipo de muestra (LMRs de

0,1 $\mu\text{g/L}$ por plaguicida individual y 0,5 $\mu\text{g/L}$ para la suma de ellos), lo que demuestra la validez del método.

- Se demostró que los CNTs seleccionados en este trabajo (MWCNTs de 10-15 nm de d.e., 2-6 nm de d.i. y 0,1-10 μm de longitud) pueden utilizarse como fases estacionarias rutinarias en SPE, debido a su bajo coste y a la pequeña cantidad necesaria para la extracción (40 mg). En este sentido, el empleo de aproximadamente 40 mg de estos MWCNTs, supone un gasto de 0,45 € por extracción, frente a unos 8 € de coste de los cartuchos de SPE convencionales.
- Se trata de la primera vez que este grupo de plaguicidas era extraído de muestras acuosas utilizando MWCNTs como fases estacionarias en SPE, así como de la primera aplicación en la que se utilizó conjuntamente un procedimiento CNTs-SPE con la CE como técnica de separación.

IV.2.- ANÁLISIS DE PLAGUICIDAS EN SUELOS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES UTILIZANDO NANOTUBOS DE CARBONO DE PARED MÚLTIPLE COMO FASES ESTACIONARIAS EN EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

En la siguiente sección se presenta la determinación de un grupo de siete OPPs (etoprofos, diazinón, metil-clorpirifos, fenitrotión, malatión, clorpirifos y fosmet) y una tiadiazina (buprofezín) en tres suelos de diferente composición (forestal, ornamental y agrícola). La metodología incluye una primera etapa de extracción con disolvente asistida por ultrasonidos (UAE) seguida de una segunda etapa de extracción y limpieza utilizando la SPE con MWCNTs como fases estacionarias. El análisis posterior se realizó mediante GC-NPD, permitiendo determinar el grupo de plaguicidas seleccionado a niveles de ng/g en los tres tipos de suelo. Esta metodología constituye el segundo trabajo existente en la bibliografía en el que se extraen plaguicidas de suelos haciendo uso de los CNTs, aunque ninguno de los plaguicidas previamente analizados coincide con los determinados en el presente estudio.

IV.2.1.-ANTECEDENTES

La aplicación de plaguicidas en el suelo constituye una amenaza para su calidad y capacidad para cumplir sus roles agrícolas y medioambientales. En general, y como ya se ha comentado con anterioridad, cuando un plaguicida entra en contacto con el suelo se une rápidamente a algunos componentes del mismo y su destino final viene gobernado por la absorción/desorción con respecto a estos componentes. Por ejemplo, la retención de un plaguicida en el suelo puede evitar el acceso inmediato del mismo hacia aguas superficiales o subterráneas y sus efectos en organismos no objetivo (ARIAS-ESTÉVEZ Y COLS., 2008), aunque también se podría producir una lixiviación gradual del mismo, provocando a la larga contaminación de las cuencas hidrográficas.

Sin embargo, su persistencia, bien como plaguicidas sin degradar o como metabolitos con actividad, constituye una amenaza para el medioambiente y la salud humana. En algunos casos incluso muestran actividad residual como, por ejemplo, los herbicidas, lo que podría impedir la germinación del cultivo de interés. Por lo tanto, el conocimiento del grado de contaminación de un suelo por un plaguicida es de particular importancia, ya que esta información es

esencial para, por un lado, tomar acciones correctivas y, por otro, evitar la contaminación de los demás compartimentos ambientales.

Debido a esta fuerte interacción de los plaguicidas con el suelo y a las bajas concentraciones a las que pueden aparecer, se requiere el desarrollo de técnicas de extracción muy eficaces y selectivas. En este sentido, lo más frecuente es realizar la extracción de los analitos con un disolvente apropiado como MeOH (SUN Y LEE, 2003), ACN (PRADO-ROSALES Y COLS., 2004) o acetona (TURIEL Y COLS., 2001), asistiendo dicha extracción mediante agitación o ultrasonidos, seguido de un procedimiento de extracción y/o limpieza mediante SPE (ANDREU Y PICÓ, 2004), utilizando en la mayoría de los casos cartuchos convencionales del tipo C₁₈. Su determinación posterior se ha llevado a cabo mayoritariamente por GC con diferentes sistemas de detección (SANTOS Y GALCERÁN, 2002).

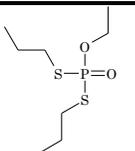
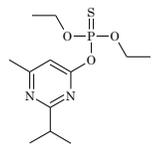
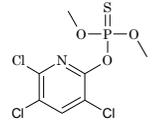
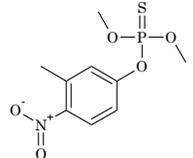
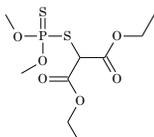
Como se ha comentado en la sección anterior, los CNTs poseen propiedades ideales para ser utilizados como materiales para SPE. En el momento del desarrollo del presente trabajo, la mayor parte de las aplicaciones en este sentido, y en lo que a compuestos orgánicos se refiere, se habían desarrollado para analizar muestras de agua, que sin duda es una matriz mucho menos compleja que los suelos. En cuanto a la extracción de compuestos orgánicos de muestras distintas de las aguas, los CNTs se habían utilizado para extraer barbitúricos (ZHAO Y COLS., 2007) y diacepinas (WANG Y COLS., 2006b) de extractos de carne de cerdo, difeniléteres polibromados de leche (WANG Y COLS., 2006a), sulfonamidas de huevos y carne de cerdo (FANG Y COLS., 2006), antidepresivos de orina (CRUZ-VERA Y COLS., 2008), compuestos orgánicos volátiles como benceno, tolueno, butilacetato, etilbenceno, xileno, estireno y undecano de muestras de aire (LIU Y COLS., 2008a) y péptidos de plasma (LI Y COLS., 2007).

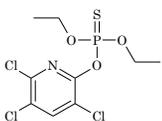
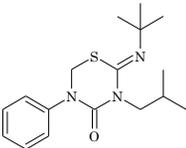
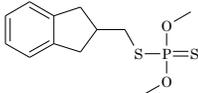
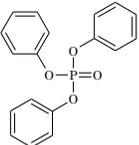
Por otra parte, sólo cuatro trabajos habían empleado CNTs para la extracción de plaguicidas de matrices complejas. Es el caso de la determinación de clortolurón, diurón, atrazina, simazina, desetil-terbutilazina, dimetoato, malatión y paratión en aceite de oliva (LÓPEZ-FERIA Y COLS., 2009), metil-paratión, paroxón y fenitrotión de extractos de ajo (DU Y COLS., 2008), etoprofos, diazinón, metil-clorpirifos, fenitrotión, malatión, clorpirifos, fenamifos y buprofezín en zumos de fruta (RAVELO-PÉREZ Y COLS., 2008a), trietilfosforotioato, tionazín, sulfotep, forato, disulfotón, metil-paratión y etil-paratión en lodos de aguas

residuales (BASHEER Y COLS., 2006) y atrazina, deisopropil-atrazina y dietil-atrazina en suelos (MIN Y COLS., 2008). Por lo tanto, el número de trabajos desarrollados a este respecto era relativamente pequeño (sólo uno de ellos en muestras de suelo), por lo que teniendo en cuenta el gran potencial que poseen los CNTs en este campo, el desarrollo de más aplicaciones contribuirá significativamente a extender su uso.

Por ello, el objetivo del trabajo desarrollado en esta sección fue estudiar el potencial de los MWCNTs como materiales para la SPE de un grupo de siete OPPs y una tiadiazina en extractos de suelo. Este grupo de plaguicidas se seleccionó por su uso extendido a nivel mundial y, específicamente en las Islas Canarias, que constituye la región con mayor producción de plátanos (cultivo en el que se usan con frecuencia estos plaguicidas) de toda la UE. Como punto de partida, se decidió adaptar una metodología previamente optimizada por nuestro grupo de investigación en la que se utilizaron MWCNTs de 10-15 nm de d.e., 2-6 nm de d.i. y 0,1-10 μm de longitud, análogos a los que se utilizaron en la anterior sección y que resultaron ser bastante más económicos que los cartuchos de SPE convencionales, para la extracción de un grupo de OPPs muy similar (etoprofos, diazinón, metil-clorpirifos, fenitrotión, malatión, clorpirifos, fenamifos y buprofezín) al seleccionado en este estudio de diferentes zumos de frutas (RAVELO-PÉREZ Y COLS., 2008a). Este procedimiento de SPE, que en el caso de los zumos fue necesario llevar a cabo una dilución previa en agua, implicaba la utilización de 40 mg de CNTs para extraer la muestra a pH 6,0, utilizando 20 mL de DCM para su elución. Bajo estas condiciones, se obtuvieron porcentajes de recuperación promedio entre 73 y 103%. Dado que la optimización se había llevado a cabo en agua Milli-Q con objeto de estudiar la influencia de cada factor sobre la extracción, sin tener en cuenta el efecto de la matriz, su adaptación al análisis de suelos podría requerir, por un lado, una posible modificación de las condiciones de SPE y, por otro, una optimización previa de la extracción del suelo con un disolvente orgánico. Dicho disolvente sería posteriormente evaporado y reconstituido en agua sobre la que se aplicaría el procedimiento de SPE.

Tabla IV.2.1.- Estructura y propiedades de los plaguicidas utilizados para este estudio.

| Plaguicida (familia) | Estructura | Actividad | Mw (g/mol) | pK _a | Solubilidad en agua (mg/L, 20 °C) | DT ₅₀ típico (días) | Log K _{ow} | K _{oc} (mL/g) |
|-------------------------|--|-------------------------|------------|-----------------|-----------------------------------|--------------------------------|---------------------|------------------------|
| Etoprofos (OPP) |  | Insecticida, nematocida | 242,3 | - | 700 | 17 | 2,99 | 110 |
| Diazinón (OPP) |  | Insecticida, acaricida | 304,4 | 2,6 | 60 | 9,1 | 3,69 | 643 |
| Metil-clorpirifos (OPP) |  | Insecticida, acaricida | 350,9 | - | 2,7 | 2,5 | 4,00 | 4645 |
| Fenitrotión (OPP) |  | Insecticida | 277,2 | - | 19 | 2,7 | 3,32 | 322 |
| Malatión (OPP) |  | Insecticida, acaricida | 330,4 | - | 145 | 0,17 | 2,75 | 217 |

| | | | | | | | | |
|-------------------------------|---|---------------------------|-------|---|------|-------|------|------|
| Clorpirifos (OPP) |  | Insecticida | 350,9 | - | 1,05 | 76 | 4,70 | 8151 |
| Buprofezín (tiadiazina) |  | Insecticida, acaricida | 305,4 | - | 0,46 | 135,4 | 4,93 | 2722 |
| Fosmet (OPP) |  | Insecticida, acaricida | 317,3 | - | 15,2 | 3,1 | 2,96 | 3212 |
| Trifenilfosfato (IS) (OPP) |  | - | 326,3 | - | - | - | - | - |

- Datos no encontrados/No aplicable. Mw: peso molecular. pK_a: constante de disociación ácida. DT₅₀: tiempo de semidesintegración o vida media. K_{ow}: coeficiente de partición octanol/agua. K_{oc}: coeficiente de adsorción de carbono orgánico del suelo (FOOTPRINT, IUPAC).

IV.2.2.- SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA MEDIANTE GC-NPD

Dado que todos los plaguicidas seleccionados contenían átomos de nitrógeno o fósforo en su estructura (ver Tabla IV.2.1), se utilizó el detector NPD para el análisis mediante GC. Como IS se empleó el trifenilfosfato (TPP), añadido siempre justo antes de la inyección del estándar o la muestra, y que había sido utilizado frecuentemente para corregir las diferencias entre inyecciones, variabilidad en la respuesta del detector debida a la matriz, etc. La Figura IV.2.1 muestra el cromatograma correspondiente a la separación de los plaguicidas seleccionados en las condiciones óptimas obtenidas (sección III.6.3). Se realizaron modificaciones en el gradiente de temperatura, sin observar mejoría en la separación de los analitos, produciendo incluso en algunos casos solapamiento de algunos de ellos. Las colas de pico son relativamente pequeñas, un hecho que se puede observar frecuente en la bibliografía cuando se emplea GC-NPD (RAVELO-PÉREZ Y COLS., 2008a, 2008b).

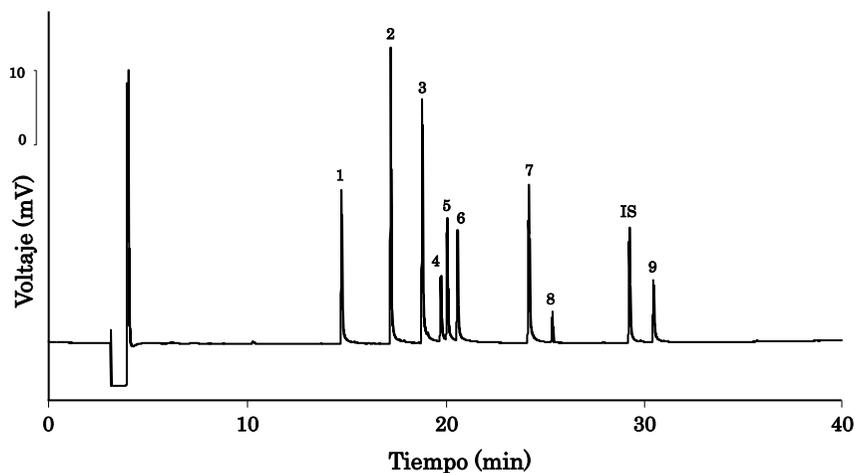


Figura IV.2.1.- Cromatograma GC-NPD de la separación de los plaguicidas seleccionados. Concentración: 0,65 mg/L de todos los plaguicidas y del IS. Flujo de nitrógeno como gas portador y de *make up*: 1,0 y 30 mL/min, respectivamente. Inyección: 2 μ L de muestra en modo *split/splitless* a 280 °C. El NPD se mantuvo a 320 °C con un flujo de nitrógeno de 4 mL/min. (1) Etoprofos, (2) diazinón, (3) metil-clorpirifos, (4) fenitrotión, (5) malatión, (6) clorpirifos, (7) buprofezín, (IS) TPP y (8) fosmet.

IV.2.3.- MUESTRAS DE SUELO SELECCIONADAS

Para llevar a cabo este trabajo se seleccionaron tres tipos de suelo: forestal, ornamental y agrícola. Todos ellos son suelos volcánicos de la isla de

Tenerife que se eligieron como representativos por sus diferentes usos y aplicaciones. La Tabla IV.2.2 muestra algunas de las propiedades disponibles de los suelos estudiados, determinadas siguiendo los procedimientos descritos en la sección III.6.1.

Tabla IV.2.2.- Algunas propiedades de los suelos seleccionados.

| Parámetro | Suelo | | |
|---|----------|------------|----------|
| | Forestal | Ornamental | Agrícola |
| Tipo | | | |
| pH (en agua) | 5,99 | 4,81 | 6,66 |
| pH (en KCl 0,1 N) | 4,78 | 4,40 | 5,92 |
| Materia orgánica (%) | - | - | 0,64 |
| Conductividad eléctrica a 25 °C ($\mu\text{S}/\text{cm}$) | 350 | 742 | 388 |

La medición del pH de un suelo proporciona una idea inicial aproximada de sus características químicas, en particular, de su porcentaje de saturación de bases. Además, el pH en KCl, que es siempre menor que en agua, indica la concentración de iones ácidos presentes en el suelo y, por tanto, puede dar una idea preliminar de la salinidad que posee. Respecto a este último aspecto, la medida de la conductividad eléctrica ofrece un diagnóstico rápido de la salinidad-alcalinidad de este tipo de muestras, ya que las sales solubles presentes en el suelo son proporcionales a su conductividad eléctrica.

Si bien no es el objetivo de este estudio, el suelo forestal fue caracterizado por el Departamento de Edafología y Geología de la Universidad de La Laguna, incluyendo parámetros como el contenido en cal y arcilla (94,3%), arcillas finas (3,8%), arcillas gruesas (1,9%), contenido de carbono (10,1%), contenido de nitrógeno (1,7%), relación C/N (5,94) y capacidad de intercambio catiónico (17,3). Cabe destacar que, debido a su alto porcentaje de cal y arcilla, no fue posible establecer el contenido de ambos grupos de componentes individualmente.

Atendiendo a los valores de pH y conductividad, el suelo agrícola seleccionado era ligeramente ácido con una saturación media en bases. Por otra parte, el suelo ornamental resultó ser muy ácido con un bajo porcentaje de saturación en bases y ausencia de elementos nutritivos solubles. Por último, el suelo forestal era ligeramente ácido, con una buena solubilidad del Fe y un

gran contenido en materia orgánica. En general, los tres suelos tenían una baja salinidad.

IV.2.4.- OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDOS

La UAE ha demostrado ser un buen método para la extracción efectiva de diferentes plaguicidas fuertemente ligados a este tipo de matrices (ANDREU Y PICÓ, 2004). De ahí que, con el objetivo de aplicar un procedimiento de SPE con CNTs a extractos acuosos de suelo y alcanzar una eficacia de extracción lo más elevada posible, se optimizó el procedimiento de UAE del grupo de plaguicidas bajo estudio partiendo de las condiciones de SPE previamente optimizadas (RAVELO-PÉREZ Y COLS., 2008a). Para ello, inicialmente, se tomaron 2 g de suelo agrícola enriquecido y se extrajeron mediante UAE durante 15 min añadiendo 10 mL de diferentes disolventes (acetato de etilo, DCM, MeOH, ACN, ciclohexano, acetona y agua), con el objetivo de seleccionar aquél que proporcionara una extracción más eficaz. Tras la extracción, se centrifugó a 4400 rpm (3000 x *g*) durante 10 min, el sobrenadante se evaporó a sequedad en rotavapor y el residuo seco se redisolvió en 20 mL de agua Milli-Q. Todas las extracciones se realizaron por triplicado ($n = 3$).

Como se puede observar en la Figura IV.2.2, el MeOH (porcentajes de recuperación en el rango 22-63%), el ciclohexano (3-58%), el ACN (6-56%) y la acetona (10-55%) proporcionaron la mejor extracción para todos los plaguicidas, aunque ni el ACN ni el ciclohexano resultaron ser efectivos para extraer el buprofezín. En el caso de la acetona, la repetibilidad entre extracciones resultó ser muy baja, por lo que se descartó su uso. Por otro lado, el acetato de etilo no extraía metil-clorpirifos, clorpirifos, buprofezín y fosmet.

Con el objetivo de mejorar la extracción y, teniendo en cuenta que el MeOH proporcionó los mejores resultados, se examinaron diferentes combinaciones de este disolvente con los otros dos más efectivos, ACN y ciclohexano (Figura IV.2.3).

Entre las dos combinaciones probadas, la mezcla MeOH/ACN proporcionó porcentajes de recuperación más elevados que aquellos obtenidos con MeOH solo, mientras que la mezcla MeOH/ciclohexano no mejoró prácticamente los resultados.

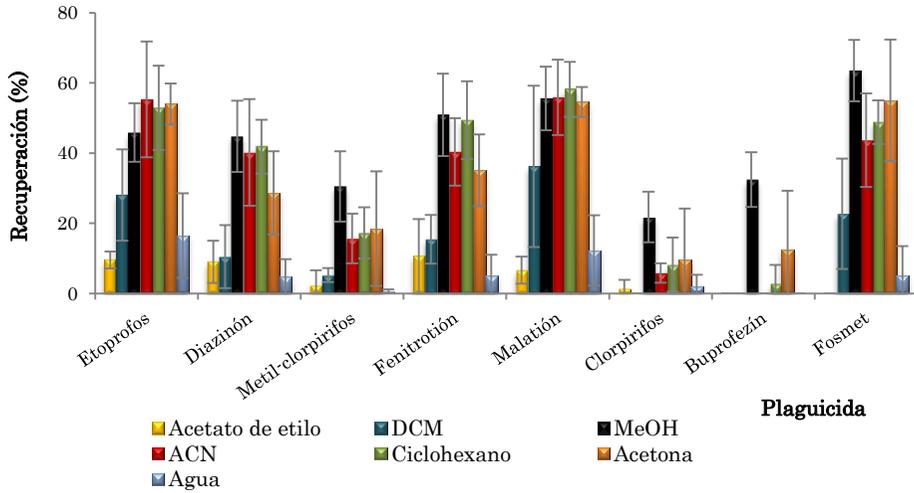


Figura IV.2.2.- Efecto de la variación del disolvente de elución en las recuperaciones de los plaguicidas en estudio ($n = 3$). Las barras de error representan la desviación estándar. Condiciones de extracción: 2,0 g de suelo, 10 mL de disolvente, 15 min de UAE, 10 min de centrifugación (4400 rpm). Condiciones de la etapa de limpieza mediante MWCNTs-SPE: plaguicidas redissueltos en 20 mL de agua a pH 6,0, 40 mg de MWCNTs, elución con 20 mL DCM.

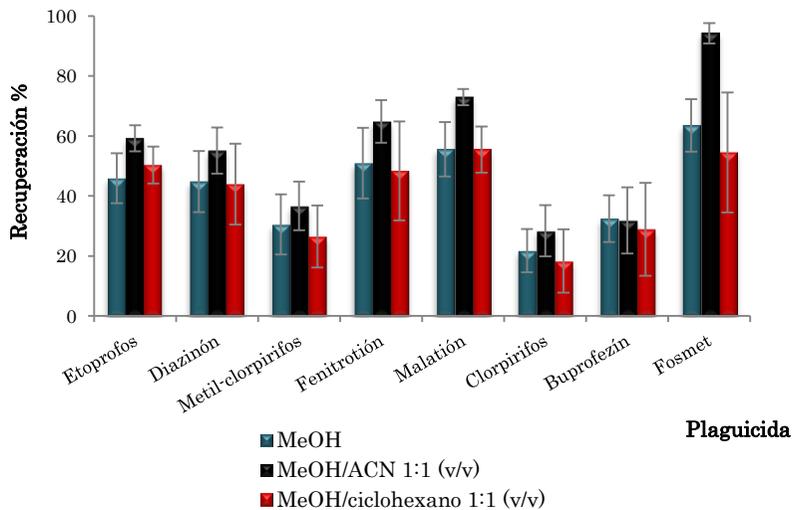


Figura IV.2.3.- Efecto de la adición de un segundo disolvente de extracción al MeOH, en proporción 1:1 (v/v), en la recuperación de los plaguicidas en estudio ($n = 3$). Resto de las condiciones como en la Figura IV.2.2.

Una vez seleccionada la mezcla de disolventes más efectiva, se varió su composición (1:3, 1:1, 3:1 v/v) y volumen (5-25 mL), así como otros parámetros como la cantidad de suelo (entre 1-2 g) y el tiempo de extracción (15-45 min). Las

experiencias realizadas demostraron que cuando se extraían 1,5 g de suelo con 10 mL de 1:1 (v/v) MeOH/ACN durante 15 min, se obtenían los porcentajes de recuperación más elevados, entre 69 y 94%, excepto para clorpirifos (23%), buprofezín (32%) y metil-clorpirifos (43%) (ver Figura IV.2.4). La mejora obtenida para 1,5 g de suelo respecto a 2,0 g se puede explicar por la disminución de la extracción de componentes de la matriz del suelo que saturan los sitios activos de los CNTs. En el caso de la extracción de 1 g de suelo, se obtenían resultados similares a la extracción de 1,5 g, por lo que se continuó con esta última cantidad con el objetivo de obtener LODs más bajos.

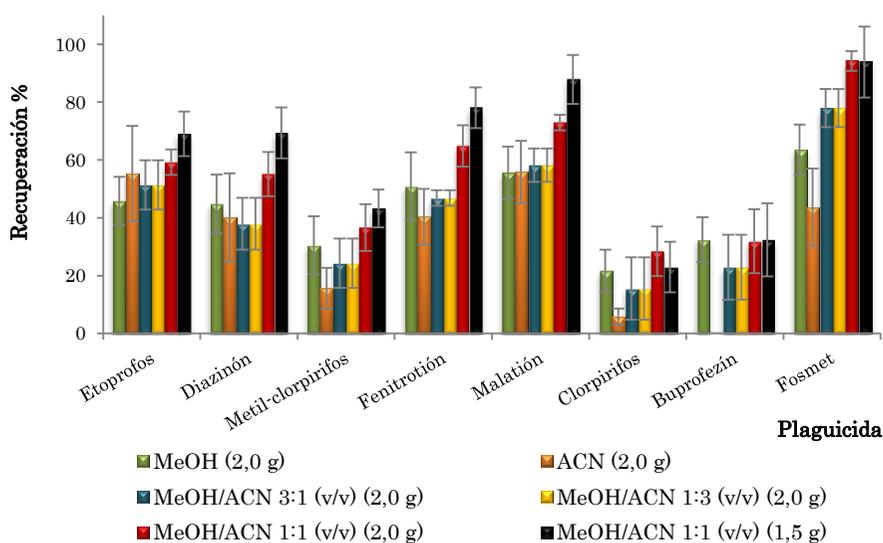


Figura IV.2.4. Efecto de las diferentes proporciones de la mezcla MeOH/ACN en la recuperación de los plaguicidas en estudio, así como de la cantidad de suelo extraído ($n = 3$). Resto de las condiciones como en la Figura IV.2.2.

Por otra parte, tiempos de extracción superiores a 15 min, así como mayores volúmenes de disolvente de elución proporcionaron resultados similares a las condiciones óptimas. Los valores más bajos de recuperación de metil-clorpirifos, clorpirifos y buprofezín (entre el 23 y el 43%), se pueden explicar por sus elevados valores de K_{oc} con respecto al resto de analitos (Tabla IV.2.1.), lo que implica una alta adsorción por parte de algunos componentes del suelo (DĄBROWSKI Y COLS., 2002; ZHU Y COLS., 2005).

Para mejorar la extracción de aquellos plaguicidas con bajo porcentaje de recuperación, se estudió también la adición de diferentes cantidades de sales,

como NaH_2PO_4 y NaCl , sugeridas previamente en la bibliografía para mejorar la extracción de OPPs de suelos (FUENTES Y COLS., 2007). Sin embargo, los resultados no mejoraron, e incluso las recuperaciones para etoprofos, diazinón y malatión empeoraron con respecto a la ausencia de sales.

IV.2.5.- MODIFICACIÓN DEL PROCEDIMIENTO DE SPE UTILIZANDO MWCNTs

Los componentes orgánicos del suelo como los ácidos húmicos y fúlvicos pueden interferir en la eficacia del procedimiento de SPE (ANDREU Y PICÓ, 2004). Por esta razón, y con el objetivo de mejorar los porcentajes de recuperación obtenidos, se realizaron algunas modificaciones de las condiciones de SPE anteriormente estudiadas (RAVELO-PÉREZ Y COLS., 2008a).

En primer lugar, se varió la cantidad de MWCNTs introducida en el cartucho entre 40 y 125 mg. Se observó que el uso de 100 mg respecto a 40 mg mejoró, aunque sólo en un 10%, las recuperaciones para algunos de los plaguicidas (diazinón, metil-clorpirifos, fenitrotión, clorpirifos y fosmet). Sin embargo, incluso utilizando 100 mg de CNTs, los valores de recuperación más bajos se obtuvieron de nuevo para clorpirifos (37%), metil-clorpirifos (54%) y buprofezín (44%). Por otro lado, el empleo de cantidades más elevadas proporcionó, en general, porcentajes de recuperación más bajos debido al aumento de la retención de los plaguicidas por parte de la fase estacionaria.

A continuación, se varió el volumen de agua Milli-Q en el que se reconstituyó el extracto seco del suelo, sin obtener mejora alguna. Como ejemplo, cabe señalar que el hecho de reconstituir en 50 mL en lugar de 20 mL, mejoró las recuperaciones tan solo para etoprofos, fenitrotión y malatión en un 20, 10 y 5%, respectivamente (82-94%), pero se obtuvieron resultados mucho peores para diazinón (recuperaciones en torno al 8%) y buprofezín, que fue completamente eluido en estas condiciones durante el procedimiento SPE.

Asimismo, se realizó la elución con diferentes volúmenes de DCM, entre 10 y 30 mL. Sin embargo, los resultados obtenidos demostraron que, incluso utilizando 100 mg de CNTs, 20 mL eran suficientes para obtener los mayores porcentajes de recuperación en las condiciones estudiadas, obteniendo una elución incompleta cuando se utilizaban volúmenes más bajos.

Por otra parte, también se contempló la introducción de un protocolo de lavado para eliminar posibles interferencias después de la etapa de carga de la muestra en el cartucho. Para ello, se hicieron pasar diferentes volúmenes de agua, sin una mejora significativa de los porcentajes de recuperación. De hecho, la introducción de un lavado proporcionaba recuperaciones menores para casi todos los analitos (entre 17 y 77%), posiblemente debido a una elución parcial de los plaguicidas.

Cuando el método optimizado se aplicó a los otros dos tipos de suelo, forestal y ornamental, se obtuvieron porcentajes de recuperación muy similares, excepto, de nuevo, para clorpirifos, metil-clorpirifos y buprofezín, que fueron ligeramente menores. Dado que los componentes del suelo varían de unos a otros, puede ser necesario ajustar los procedimientos de extracción para cada uno de ellos, variando ligeramente los parámetros que afectan a los mismos. En consecuencia, se realizaron pequeños cambios en la etapa inicial de extracción, así como en el procedimiento de SPE posterior, sin obtener mejoras claras. Por ello, se decidió utilizar el procedimiento desarrollado inicialmente para los tres tipos de suelo.

Por último, se llevaron a cabo pruebas para evaluar la reutilización de los CNTs, ya que en alguna ocasión había sido sugerido en la bibliografía (LÓPEZ-FERIA Y COLS., 2009). Para ello, se extrajeron cinco muestras de suelo agrícola mediante UAE y, posteriormente, se pasaron los extractos acuosos consecutivamente a través del mismo cartucho, realizando la activación y la elución en el mismo modo para cada muestra. De estos experimentos, se pudo observar que los valores promedio de las recuperaciones disminuían de una extracción a la siguiente y, por tanto, en este caso particular en el que las muestras eran muy complejas, el cartucho sólo se podía utilizar una vez. Posiblemente, la principal causa de esta reducción de la eficacia de la extracción fuera que tenía lugar una retención irreversible de algunos componentes del suelo en los sitios activos de los MWCNTs que impedía la extracción efectiva de los plaguicidas.

IV.2.6.- VALIDACIÓN DEL MÉTODO

Una vez optimizado el método UAE-MWCNTs-SPE-GC-NPD, se procedió

a la validación del mismo, llevando a cabo los correspondientes estudios de calibración, de recuperaciones y de precisión y exactitud.

IV.2.6.1.- CALIBRADO EN LA MATRIZ

Desde un punto de visto analítico, los suelos se encuentran entre las matrices más complejas y, por tanto, es muy probable que la cuantificación de los compuestos por GC se vea afectada por efectos de la matriz de la muestra (DABROWSKI Y COLS., 2002; POOLE, 2007). Cuando se trabaja con muestras complejas, el efecto combinado de los componentes de la matriz, diferentes a los compuestos de interés, pueden afectar a la señal cromatográfica, aumentándola, en la mayoría de los casos, o incluso, disminuyéndola. Esto se debe a que, en general, los componentes de la matriz ocupan los sitios activos de la columna cromatográfica que de otro modo interactuarían con los analitos, lo que conduce a menores pérdidas y a una señal más intensa.

Una forma de evaluar y corregir el efecto matriz es obtener las rectas de calibrado en la propia matriz, es decir, someter a muestras que no contienen los analitos a todo el procedimiento de extracción, enriquecer el extracto final con los analitos de interés y comparar dichas rectas con las obtenidas al disolver los analitos en el disolvente final puro (ciclohexano en este caso). Una comparación estadística de las pendientes y ordenadas en el origen de las rectas permite determinar la presencia o ausencia de este efecto que, de existir, se corregiría realizando la correspondiente cuantificación con la recta de calibrado obtenida con los analitos en la matriz.

La Tabla IV.2.3 muestra los datos de calibración de los estándares disueltos en ciclohexano y en el extracto de cada tipo de suelo ($n = 6$ en todos los casos). La respuesta del detector fue lineal para cada plaguicida en el rango estudiado, con coeficientes de determinación (R^2) superiores a 0,996. Para comprobar la existencia de efecto matriz, se llevó a cabo una comparación estadística entre el calibrado en ciclohexano y en cada extracto de suelo utilizando un programa estadístico (*StatGraphics Plus* v. 5.1) que realizaba un test de *Fisher* calculando los parámetros F (función de decisión) y p (probabilidad). Dicho programa comparaba, de dos en dos, las pendientes y las ordenadas en el origen de las curvas de calibrado para cada analito. Si en el test

se obtenía un valor de p más bajo que el nivel de significación α , la hipótesis nula se rechazaba. Es decir, cuando el valor de p para la comparación de pendientes u ordenadas en el origen era $\leq \alpha = 0,1$ (10%), existían diferencias estadísticas y, por tanto, existía efecto matriz.

La Tabla IV.2.3 muestra que, para el suelo forestal existe efecto matriz para todos los plaguicidas, excepto para diazinón, metil-clorpirifos y buprofezín. Para el suelo ornamental, sólo el fenitrotión y el fosmet mostraban efecto matriz, lo cual es completamente opuesto a lo que se obtuvo para el suelo agrícola, en el que la señal cromatográfica para todos los plaguicidas se vio influenciada por los componentes de la matriz. Sin embargo, cuando los calibrados en cada tipo de suelo se compararon entre sí, entre el suelo forestal y el ornamental, no se observaron diferencias significativas para ningún plaguicida, excepto para fenitrotión y clorpirifos. Sin embargo, entre el suelo forestal y el agrícola, existió efecto matriz para todos, excepto para buprofezín y fosmet, mientras que entre el suelo ornamental y el agrícola, existió para todos excepto para fenitrotión y clorpirifos. Vista la heterogeneidad de los resultados obtenidos, se llevó a cabo siempre el calibrado en la matriz para cada analito en cada tipo de suelo.

Es importante destacar que en ninguno de los tres tipos de suelos se encontraron residuos de los plaguicidas seleccionados o interferencias cromatográficas de la matriz de la muestra. La Figura IV.2.5 muestra, como ejemplo, el cromatograma de un estándar en la matriz del suelo forestal, y el análisis de un blanco del mismo. Para los otros dos tipos de suelo se obtuvieron cromatogramas muy parecidos.

Los LODs instrumentales obtenidos, calculados como la concentración que proporcionó una S/N de 3, fueron similares para los estándares en ciclohexano puro y en los tres extractos de suelo: entre 3,02 y 23,3 $\mu\text{g/L}$ para el primero, entre 2,97 y 24,7 $\mu\text{g/L}$ para el suelo forestal, entre 2,61 y 26,9 $\mu\text{g/L}$ para el ornamental, y entre 2,96 y 26,0 $\mu\text{g/L}$ para el agrícola. En cuanto a los LOQs, calculados como la concentración que proporcionó una S/N de 10, se obtuvieron entre 10,1 y 77,6 $\mu\text{g/L}$, entre 9,88 y 82,5 $\mu\text{g/L}$, entre 8,70 y 89,6 $\mu\text{g/L}$, y entre 9,88 y 86,6 $\mu\text{g/L}$, respectivamente. Tanto los LODs como los LOQs se verificaron experimentalmente.

Tabla IV.2.3.- Datos de calibración del grupo de plaguicidas seleccionado (estándares preparados en ciclohexano y en el extracto final de cada tipo de suelo tras aplicar la metodología UAE-MWCNTs-SPE-GC-NPD) y comprobación del efecto matriz.

| Plaguicida | Suelo | Rango lineal (mg/L) | $b \pm t S_b$ | $a \pm t S_a$ | R^2 | LOD ^{a)} (µg/L) | Efecto matriz ^{b)} | Efecto matriz ^{c)} | Efecto matriz ^{d)} |
|-------------------|------------------|---------------------|-----------------|--------------------|-------|--------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Etoprofos | Ciclohexano puro | 0,024-1,69 | $1,81 \pm 0,10$ | $0,056 \pm 0,073$ | 0,998 | 3,96 | - | - | - |
| | Forestal | 0,085-1,69 | $1,66 \pm 0,14$ | $0,082 \pm 0,132$ | 0,997 | 3,68 | Sí | No | Sí |
| | Ornamental | 0,085-1,69 | $1,69 \pm 0,17$ | $0,072 \pm 0,155$ | 0,996 | 3,51 | No | - | Sí |
| | Agrícola | 0,085-1,69 | $1,95 \pm 0,06$ | $0,008 \pm 0,059$ | 0,999 | 4,14 | Sí | - | - |
| Diazinón | Ciclohexano puro | 0,038-2,63 | $1,70 \pm 0,13$ | $0,121 \pm 0,151$ | 0,997 | 3,16 | - | - | - |
| | Forestal | 0,132-2,63 | $1,57 \pm 0,15$ | $0,155 \pm 0,219$ | 0,996 | 3,29 | No | No | Sí |
| | Ornamental | 0,132-2,63 | $1,62 \pm 0,16$ | $0,215 \pm 0,233$ | 0,996 | 2,65 | No | - | Sí |
| | Agrícola | 0,132-2,63 | $1,81 \pm 0,15$ | $0,160 \pm 0,218$ | 0,997 | 3,25 | Sí | - | - |
| Metil-clorpirifos | Ciclohexano puro | 0,030-2,10 | $2,32 \pm 0,14$ | $0,037 \pm 0,124$ | 0,998 | 3,02 | - | - | - |
| | Forestal | 0,105-2,10 | $2,18 \pm 0,21$ | $0,074 \pm 0,244$ | 0,996 | 2,97 | No | No | Sí |
| | Ornamental | 0,105-2,10 | $2,23 \pm 0,16$ | $0,134 \pm 0,182$ | 0,998 | 2,61 | No | - | Sí |
| | Agrícola | 0,105-2,10 | $2,44 \pm 0,15$ | $0,203 \pm 0,177$ | 0,999 | 2,96 | Sí | - | - |
| Fenitrotión | Ciclohexano puro | 0,038-1,07 | $1,30 \pm 0,02$ | $-0,014 \pm 0,009$ | 0,999 | 5,62 | - | - | - |
| | Forestal | 0,053-1,07 | $1,32 \pm 0,07$ | $0,002 \pm 0,043$ | 0,999 | 5,36 | Sí | Sí | Sí |
| | Ornamental | 0,053-1,07 | $1,38 \pm 0,08$ | $0,012 \pm 0,048$ | 0,999 | 4,97 | Sí | - | No |
| | Agrícola | 0,053-1,07 | $1,35 \pm 0,08$ | $0,017 \pm 0,049$ | 0,999 | 5,32 | Sí | - | - |

(Continúa en la página siguiente)

Tabla IV.2.3.- (Continuación)

| Plaguicida | Suelo | Rango lineal (mg/L) | $b \pm t S_b$ | $a \pm t S_a$ | R^2 | LOD ^{a)} (µg/L) | Efecto matriz ^{b)} | Efecto matriz ^{c)} | Efecto matriz ^{d)} |
|-------------|------------------|---------------------|---------------|----------------|-------|--------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Malatión | Ciclohexano puro | 0,025-1,77 | 1,51 ± 0,07 | 0,025 ± 0,047 | 0,999 | 5,14 | - | - | - |
| | Forestal | 0,089-1,77 | 1,24 ± 0,11 | 0,055 ± 0,107 | 0,997 | 5,28 | Sí | No | Sí |
| | Ornamental | 0,089-1,77 | 1,27 ± 0,10 | 0,058 ± 0,095 | 0,998 | 4,65 | No | - | Sí |
| | Agrícola | 0,089-1,77 | 1,40 ± 0,09 | 0,043 ± 0,082 | 0,999 | 4,15 | Sí | - | - |
| Clorpirifos | Ciclohexano puro | 0,026-1,81 | 1,29 ± 0,05 | 0,026 ± 0,036 | 0,999 | 5,89 | - | - | - |
| | Forestal | 0,090-1,81 | 1,19 ± 0,10 | 0,040 ± 0,099 | 0,997 | 6,22 | Sí | Sí | Sí |
| | Ornamental | 0,090-1,81 | 1,30 ± 0,10 | 0,045 ± 0,094 | 0,998 | 5,34 | No | - | No |
| | Agrícola | 0,090-1,81 | 1,32 ± 0,10 | 0,072 ± 0,094 | 0,998 | 6,02 | Sí | - | - |
| Buprofezín | Ciclohexano puro | 0,104-2,08 | 0,266 ± 0,005 | -0,001 ± 0,005 | 0,999 | 23,3 | - | - | - |
| | Forestal | 0,104-2,08 | 0,253 ± 0,016 | 0,003 ± 0,018 | 0,999 | 24,7 | No | No | No |
| | Ornamental | 0,104-2,0 | 0,260 ± 0,011 | 0,004 ± 0,011 | 0,999 | 26,9 | No | - | Sí |
| | Agrícola | 0,104-2,0 | 0,248 ± 0,014 | 0,003 ± 0,016 | 0,999 | 26,0 | Sí | - | - |
| Fosmet | Ciclohexano puro | 0,027-1,88 | 1,05 ± 0,06 | -0,062 ± 0,047 | 0,998 | 8,87 | - | - | - |
| | Forestal | 0,094-1,88 | 1,12 ± 0,10 | -0,027 ± 0,104 | 0,997 | 9,45 | Sí | No | No |
| | Ornamental | 0,094-1,88 | 1,15 ± 0,10 | -0,033 ± 0,099 | 0,997 | 8,64 | Sí | - | Sí |
| | Agrícola | 0,094-1,88 | 1,08 ± 0,06 | -0,035 ± 0,063 | 0,999 | 8,45 | Sí | - | - |

- No aplicable. a) Calculado como la concentración capaz de proporcionar una relación S/N de 3. b) Efecto matriz con respecto a los estándares disueltos en ciclohexano puro. c) Efecto matriz con respecto a los estándares disueltos en la matriz del suelo ornamental. d) Efecto matriz con respecto a los estándares disueltos en la matriz del suelo agrícola. 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^2 : coeficiente de determinación ($n = 6$).

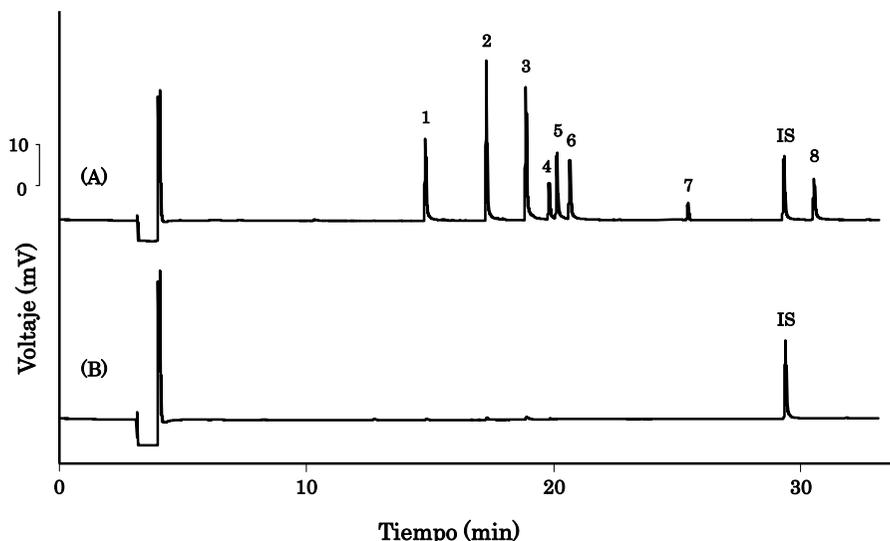


Figura IV.2.5. Cromatograma obtenido tras el procedimiento UAE-MWCNTs-SPE-GC-NPD de (A) una muestra enriquecida de suelo forestal (concentración: aprox. 500 ng/g de cada plaguicida); (B) un blanco del suelo forestal después de aplicar las condiciones óptimas de extracción. Resto de las condiciones análogas a las de la Figura IV.2.1. (1) Etoprofos, (2) diazinón, (3) metil-clorpirifos, (4) fenitrotión, (5) malatión, (6) clorpirifos, (7) buprofezín, (IS) TPP y (8) fosmet.

IV.2.6.2.- ESTUDIO DE RECUPERACIONES

La repetibilidad de la metodología desarrollada fue evaluada mediante la realización de un estudio de recuperaciones a dos niveles de concentración diferentes para los tres suelos. Todas las experiencias se llevaron a cabo por quintuplicado ($n = 5$) a cada nivel. Los resultados de este estudio, al igual que los niveles de concentración y los LODs del método, se muestran en la Tabla IV.2.4.

Los porcentajes de recuperación absoluta promedio se calcularon mediante comparación de la relación A/A_{IS} con la obtenida para los estándares en la matriz. De esta forma, se obtuvieron recuperaciones entre el 54 y el 91% para todos los plaguicidas en los tres tipos de suelo, excepto para metil-clorpirifos, clorpirifos y buprofezín, para los cuales se obtuvieron valores entre el 12 y el 54%. Las RSD fueron menores del 20% en todos los casos. Los LODs del método variaron entre 2,97 y 72,4 ng/g para todos los plaguicidas, valores que son del mismo orden de magnitud que los obtenidos generalmente en la bibliografía utilizando SPE tras una UAE con un disolvente adecuado (DĄBROWSKI Y COLS., 2002; LESUEUR Y COLS., 2006; DÍAZ-CRUZ Y COLS., 2006).

Tabla IV.2.4. - Valores de recuperación absoluta promedio (% R), de RSD, concentración añadida de plaguicida y LODs de la metodología UAE-MWCNTs-SPE-GC-NPD para cada tipo de suelo.

| Plaguicida | Suelo forestal | | | Suelo ornamental | | | Suelo agrícola | | |
|-------------------|---|---|---------------|---|---|---------------|---|---|---------------|
| | Nivel 1 % R ^{a)} (RSD, %) (Conc., ng/g) | Nivel 2 % R ^{a)} (RSD, %) (Conc., ng/g) | LOD (ng/g) | Nivel 1 % R ^{a)} (RSD, %) (Conc., ng/g) | Nivel 2 % R ^{a)} (RSD, %) (Conc., ng/g) | LOD (ng/g) | Nivel 1 % R ^{a)} (RSD, %) (Conc., ng/g) | Nivel 2 % R ^{a)} (RSD, %) (Conc., ng/g) | LOD (ng/g) |
| | Etoprofos | 70 (7) (202) | 82 (8) (403) | 3,49 | 80 (4) (202) | 73 (5) (403) | 3,06 | 65 (9) (202) | 67 (9) (403) |
| Diazinón | 69 (10) (314) | 73 (7) (627) | 2,97 | 54 (15) (314) | 60 (16) (627) | 3,10 | 69 (4) (314) | 69 (6) (627) | 3,14 |
| Metil-clorpirifos | 30 (15) (250) | 44 (18) (500) | 5,65 | 32 (18) (250) | 26 (14) (500) | 6,02 | 49 (10) (250) | 45 (14) (500) | 4,22 |
| Fenitrotión | 64 (17) (127) | 70 (9) (254) | 5,60 | 54 (18) (127) | 56 (16) (254) | 6,06 | 69 (8) (127) | 72 (4) (254) | 5,04 |
| Malatión | 77 (5) (211) | 91 (7) (422) | 4,10 | 81 (8) (211) | 78 (4) (422) | 3,92 | 81 (6) (211) | 77 (4) (422) | 3,50 |
| Clorpirifos | 17 (6) (215) | 24 (20) (430) | 19,9 | 14 (20) (215) | 12 (14) (430) | 27,6 | 23 (18) (215) | 22 (20) (430) | 17,7 |
| Buprofezín | 27 (9) (248) | 33 (9) (496) | 52,2 | 25 (20) (248) | 23 (15) (496) | 72,4 | 54 (20) (248) | 41 (17) (496) | 37,4 |
| Fosmet | 61 (9) (216) | 78 (7) (431) | 8,66 | 66 (15) (216) | 56 (4) (431) | 9,49 | 79 (11) (216) | 63 (6) (431) | 8,06 |

a) Media de cinco extracciones ($n = 5$), 1,5 g de suelo.

En el único trabajo publicado hasta el momento en el que se utilizaron MWCNTs como fases estacionarias en SPE para el análisis de tres plaguicidas (atrazina, deisopropil-atrazina y dietil-atrazina) en suelos (MIN Y COLS., 2008), se obtuvieron recuperaciones entre el 72 y el 85%. En este caso, se utilizaron 30 mL de una mezcla 1:1 (v/v) MeOH/agua para extraer 10 g de suelo, y tras la correspondiente evaporación, el extracto acuoso se sometió a un procedimiento de SPE con 100 mg de MWCNTs de 40-60 nm de d.i., que son CNTs de mayor dimensión que los utilizados en este trabajo. Como técnica analítica se utilizó GC-MS. Los LODs obtenidos, como era de esperar al utilizar este tipo de detección, que además permitía extraer una mayor cantidad de suelo, fueron inferiores a los obtenidos en este trabajo, entre 0,3 y 1 ng/g.

Como se comentó en la sección IV.2.4, los bajos porcentajes de recuperación obtenidos para metil-clorpirifos, clorpirifos y buprofezín en los tres tipos de suelos se pueden justificar por sus elevados valores de K_{oc} . Estos valores dependen del tipo de suelo y, por ello, la recuperación de estos plaguicidas en el suelo agrícola fue ligeramente mayor que en los dos restantes, especialmente para el buprofezín (41-54%). Las bajas recuperaciones de clorpirifos y metil-clorpirifos en este tipo de muestra ya había sido observada previamente por diversos autores que también utilizaron un procedimiento UAE-SPE para su extracción (DĄBROWSKI Y COLS., 2002; ZHU Y COLS., 2008).

IV.2.6.3.- ESTUDIO DE PRECISIÓN Y EXACTITUD

Para demostrar la aplicabilidad del método desarrollado, cada muestra de suelo se enriqueció con los plaguicidas que se recuperaron en mayor porcentaje (etoprofos, diazinón, fenitrotión, malatión y fosmet) a dos niveles de concentración diferentes y se analizaron mediante el método propuesto por quintuplicado ($m = 5$). La concentración encontrada para cada plaguicida fue comparada con la concentración añadida utilizando el test t de *Student*. Los resultados se muestran en la Tabla IV.2.5.

Como se puede observar, en todos los casos se obtuvieron valores de t menores que el tabulado (2,78 para $m - 1 = 4$, $\alpha = 0,05$) y, consecuentemente, la hipótesis nula se puede aceptar, o lo que es lo mismo, no se observaron diferencias significativas entre el valor de concentración añadido y el obtenido.

Tabla IV.2.5. - Resultados del estudio de precisión y exactitud de la metodología UAE-MWCNTs-SPE-GC-NPD propuesta, para cada plaguicida y tipo de suelo.

| Plaguicida | Suelo | Conc. añadida ($\mu\text{g/g}$) | Conc. encontrada ($\mu\text{g/g}$) ^{a)} | Exactitud (%) | δ^b |
|-------------|------------|-----------------------------------|--|---------------|------------|
| Etoprofos | Forestal | 0,56 | 0,58 \pm 0,08 | 102 | 1,68 |
| | Ornamental | | 0,59 \pm 0,10 | 105 | 1,16 |
| | Agrícola | | 0,51 \pm 0,04 | 90 | 2,75 |
| | Forestal | 0,77 | 0,76 \pm 0,08 | 99 | 0,17 |
| | Ornamental | | 0,80 \pm 0,10 | 105 | 1,79 |
| | Agrícola | | 0,81 \pm 0,04 | 106 | 2,09 |
| Diazinón | Forestal | 0,88 | 0,77 \pm 0,16 | 87 | 2,36 |
| | Ornamental | | 0,95 \pm 0,21 | 109 | 1,83 |
| | Agrícola | | 0,86 \pm 0,14 | 98 | 0,53 |
| | Forestal | 1,19 | 1,15 \pm 0,16 | 97 | 0,86 |
| | Ornamental | | 1,24 \pm 0,21 | 104 | 0,64 |
| | Agrícola | | 1,26 \pm 0,14 | 106 | 2,66 |
| Fenitrotión | Forestal | 0,36 | 0,32 \pm 0,05 | 90 | 1,62 |
| | Ornamental | | 0,38 \pm 0,05 | 105 | 1,83 |
| | Agrícola | | 0,37 \pm 0,04 | 103 | 0,80 |
| | Forestal | 0,48 | 0,45 \pm 0,04 | 93 | 2,41 |
| | Ornamental | | 0,49 \pm 0,05 | 102 | 0,23 |
| | Agrícola | | 0,51 \pm 0,04 | 106 | 1,77 |

| | | | | | |
|----------|------------|------|-------------|-----|------|
| Malatión | Forestal | | 0,58 ± 0,08 | 98 | 0,71 |
| | Ornamental | 0,59 | 0,63 ± 0,07 | 106 | 2,30 |
| | Agrícola | | 0,60 ± 0,06 | 102 | 2,16 |
| | Forestal | | 0,82 ± 0,09 | 103 | 0,62 |
| | Ornamental | 0,80 | 0,88 ± 0,08 | 110 | 2,05 |
| | Agrícola | | 0,82 ± 0,06 | 103 | 1,62 |
| Fosmet | Forestal | | 0,57 ± 0,11 | 90 | 2,69 |
| | Ornamental | 0,63 | 0,67 ± 0,12 | 108 | 2,55 |
| | Agrícola | | 0,67 ± 0,07 | 106 | 2,78 |
| | Forestal | | 0,89 ± 0,11 | 104 | 0,74 |
| | Ornamental | 0,85 | 1,00 ± 0,11 | 117 | 2,76 |
| | Agrícola | | 0,91 ± 0,07 | 107 | 1,15 |

a) Media ± intervalo de confianza de cinco extracciones ($m = 5$). b) $t_{ab} = 2,78$, $m - 1 = 4$, $\alpha = 0,05$

El grado de concordancia entre la concentración añadida y la encontrada se encontró entre el 87 y el 117%, lo que demuestra claramente la idoneidad del método propuesto y la viabilidad del uso de los MWCNTs como nuevos sistemas de extracción de los plaguicidas seleccionados en muestras de suelo.

IV.2.7.- CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en esta sección, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- Se desarrolló un nuevo método de análisis de ocho plaguicidas, en su mayoría OPPs (etoprofos, diazinón, metil-clorpirifos, fenitrotión, malatión, clorpirifos y fosmet) y una tiadiazina (buprofezín) en muestras de suelo (forestal, ornamental y agrícola) mediante UAE-MWCNTs-SPE-GC-NPD.
- La etapa de UAE fue optimizada con objeto de obtener porcentajes de recuperación lo más elevados posible, obteniendo como mejores condiciones el empleo de 1,5 g de suelo, 10 mL de una mezcla 1:1 (v/v) ACN/MeOH y un tiempo de extracción de 15 min.
- La etapa de extracción y limpieza de los extractos acuosos de los suelos se llevó a cabo utilizando MWCNTs de pequeño d.i. (10-15 nm) como fase estacionaria en SPE. Las mejores condiciones de extracción implicaron el uso de 100 mg de MWCNTs, 20 mL de extracto acuoso de suelo a pH 6,0 y 20 mL de DCM como disolvente de elución.
- El estudio del efecto matriz para cada tipo de suelo demostró la necesidad de utilizar un calibrado específico en cada matriz. En todos los casos se obtuvo una buena linealidad ($R^2 \geq 0,996$). Además, considerando la complejidad de la matriz de la muestra, se obtuvieron porcentajes de recuperación absoluta satisfactorios (54-91%) para etoprofos, diazinón, fenitrotión, malatión y fosmet, mientras que para los plaguicidas que mostraron una mayor retención en la matriz del suelo (clorpirifos, metil-clorpirifos y buprofezín), éstos fueron algo menores. Sin embargo, en todos los casos, los LODs se encontraron en el rango de concentración ng/g (2,97-72,4 ng/g), y fueron del mismo orden de magnitud que los obtenidos generalmente en la bibliografía.

- La validación del método demostró su utilidad para la correcta cuantificación de este grupo de plaguicidas en muestras de suelo enriquecidas. En el caso particular del análisis de aquellos plaguicidas con mayores porcentajes de recuperación (etoprofos, diazinón, fenitrotión, malatión y fosmet), el estudio de precisión y exactitud demostró que se obtenían niveles de exactitud altos (entre 87 y 117%) con una buena precisión analítica. Además, debido al uso de pequeñas cantidades de MWCNTs (100 mg) y de suelo (1,5 g), la metodología implica un bajo coste y bajos requerimientos de muestra.

IV.3.- EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA DISPERSIVA CON NANOTUBOS DE CARBONO COMBINADA CON NANO-CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA PARA EL ANÁLISIS DE PLAGUICIDAS EN AGUAS

En esta sección se llevó a cabo la separación simultánea de un grupo de doce plaguicidas (carbaril, fensulfotión, mecoprop, fenamifos, haloxifop, diclofop, fipronil, profenofos, fonofos, disulfotón, nitrofén y terbufos) mediante nano-LC con detección UV. Para ello se utilizó una columna capilar de 100 μm de d.i. y 25 cm de longitud empaquetada manualmente en el laboratorio con partículas de sílice modificadas con grupos fenilo (Pinnacle II Phenyl). Se trata de la primera vez que estos plaguicidas son simultáneamente analizados por nano-LC. Con objeto de llevar a cabo una preconcentración en línea e incrementar así la sensibilidad, se utilizó una micro-precolumna. Por otra parte, se optimizó un procedimiento de dSPE para la extracción de los plaguicidas de estudio de agua Milli-Q utilizando MWCNTs de 10-15 nm de d.e. y 2-6 nm de d.i. El método se validó mediante un estudio de recuperaciones a tres niveles de concentración diferentes, obteniendo LODs que oscilaron entre 0,016 y 0,067 $\mu\text{g/L}$ (por debajo de los LMRs establecidos por la UE) para la mayoría de los plaguicidas. Los MWCNTs se reutilizaron hasta cinco veces, representando una importante reducción en el gasto de fase estacionaria. Además, la dSPE permitió una clara disminución del tiempo total de tratamiento de muestra respecto a la SPE convencional. Este trabajo constituye la primera aplicación de la dSPE utilizando CNTs para la extracción de plaguicidas, así como la primera combinación de CNTs-SPE y nano-LC.

IV.3.1.- ANTECEDENTES

El empleo de la nano-LC, respecto a la HPLC convencional, supone una importante reducción de la cantidad de fase estacionaria, un hecho que es particularmente importante cuando se utilizan rellenos costosos, como las fases quirales. Además, tal como se comentó en la sección I.2.2.1, esta técnica supone también un menor consumo de disolventes, disminuyendo los costes operacionales y siendo incluso considerada como una técnica ecológica. También es de destacar que los bajos flujos empleados facilitan su acoplamiento con la MS.

En general, el número de publicaciones que utilizan la nano-LC para el

análisis de plaguicidas es relativamente bajo. Además, en la mayoría de los casos, los estudios se han enfocado a la evaluación de instrumentación especializada para esta técnica miniaturizada (MONETI Y COLS., 2001; CAPPIELLO Y COLS., 2002b, 2003) o para la separación o separación enantiomérica de grupos de plaguicidas (ROSALES-CONRADO Y COLS., 2004; FANALI Y COLS., 2006), sin considerar su determinación en muestras reales ni desarrollar protocolos de extracción adecuados. A modo de ejemplo, Fanali y cols. (2006) estudiaron la enantioseparación de mecoprop, diclorprop, fenoprop, fluazifop, flamprop, diclofop, fenoxaprop y haloxifop utilizando un columna de 100 μm de d.i. y 23 cm empaquetada con una fase estacionaria quiral de 5 μm basada en una amida derivada del ácido tartárico (tartardiamida *tert*-butilbenzoilada).

Sin embargo, son muy pocos los trabajos que se han desarrollado para la determinación de plaguicidas en muestras de interés medioambiental (CAPPIELLO Y COLS., 2002b; FAMIGLINI Y COLS., 2005, 2008). En este sentido, se habían utilizado siempre columnas de 15 cm de longitud y 75 μm de d.i., rellenas con partículas de sílice- C_{18} de 3 μm (CAPPIELLO Y COLS., 2002b; FAMIGLINI Y COLS., 2005) o 3,5 μm (FAMIGLINI Y COLS., 2008) para la extracción de plaguicidas de aguas, utilizando en los tres casos una SPE con diferentes fases estacionarias como método de preconcentración fuera de línea, así como detección por MS. Cappelletto y cols. (2002b) determinaron cuatro OPPs en agua de río utilizando un cartucho de GCB, alcanzando LODs de aproximadamente 3 ng/L. Por otra parte, Famiglini y cols. (2005) analizaron ocho plaguicidas de diferentes familias en agua de mar, utilizando SPE con cartuchos Oasis HLB y obteniendo LODs entre 0,4 y 119 ng/L, mientras que en otra ocasión determinaron doce OCPs en agua Milli-Q, de mar y de río utilizando sílice- C_{18} como fase estacionaria en SPE, alcanzando LODs entre 44 y 330 ng/L. Por tanto, dada la escasez de aplicaciones prácticas, siempre son bienvenidos los estudios que tengan como objetivo explorar el potencial de esta técnica en el análisis medioambiental.

De forma general, el paso limitante en SPE es la etapa de carga de la muestra, que se puede llevar a cabo por gravedad o bien asistida por presión o vacío. Dependiendo del LOD instrumental y, por tanto, del volumen de muestra a extraer, esta etapa puede requerir un tiempo relativamente largo, ya que la velocidad de flujo es un parámetro crítico. Una de las variaciones de la técnica

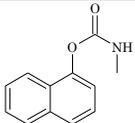
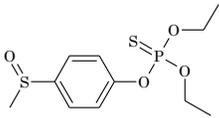
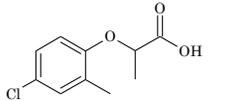
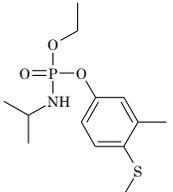
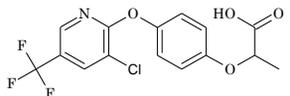
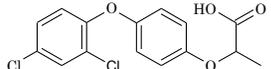
que reduce considerablemente el tiempo y simplifica la extracción es la dSPE. Este modo se ha utilizado generalmente como etapa de limpieza de la matriz, es decir, el sorbente dispersivo se añade a la disolución orgánica que se ha utilizado para extraer los analitos de interés de la matriz, de forma que las posibles interferencias quedan retenidas en él para, finalmente, descartar el sorbente y utilizar el sobrenadante. Sin embargo, aunque no se trata de un procedimiento habitual, los materiales sorbentes también se pueden utilizar en el modo dispersivo con el objetivo de retener los analitos, que posteriormente serán eluidos/desorbidos con el disolvente más adecuado (TSAI Y COLS., 2009; LU Y COLS., 2010; PENG Y COLS., 2010).

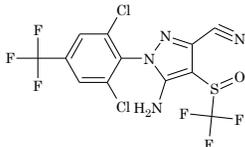
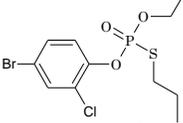
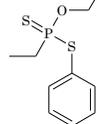
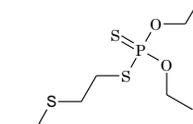
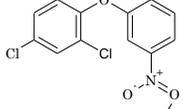
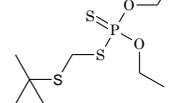
En lo que a los CNTs se refiere, y como ya se ha señalado en algunas de las secciones anteriores, se han utilizado ampliamente para la extracción de compuestos orgánicos e inorgánicos, incluyendo plaguicidas (PYRZYNSKA, 2011), sobre todo de muestras acuosas. Sin embargo, en prácticamente todas estas aplicaciones, la extracción se llevó a cabo mediante SPE en el modo convencional, con una columna o disco fabricado manualmente en el laboratorio, ya que hasta el momento no están disponibles comercialmente en ese formato. Sólo en muy pocos casos, se había utilizado la dSPE. Estas escasas aplicaciones incluyen la extracción de iones metálicos utilizando MWCNTs oxidados (ZANG Y COLS., 2009), quinolonas con MWCNTs magnéticos (MORALES-CID Y COLS., 2010) o tensioactivos catiónicos también con MWCNTs oxidados (SHRIVAS Y WU, 2008). En ningún caso, se habían utilizado CNTs no modificados. Además, hasta la fecha de realización de la presente Tesis Doctoral, la dSPE con CNTs no se había utilizado para la extracción de plaguicidas, ni tampoco se había combinado la SPE, ni en el modo convencional ni en el dispersivo, con CNTs como sorbentes con la nano-LC.

IV.3.2.- SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA MEDIANTE NANO-LC-UV

La Tabla IV.3.1 muestra las estructuras, familias y propiedades de los plaguicidas seleccionados para el presente estudio. Tras una intensa y detallada revisión de la bibliografía se confirmó que este grupo no había sido simultáneamente separado de forma previa mediante nano-LC. Incluso, cuatro de los doce plaguicidas (fipronil, disulfotón, nitrofén y terbufos) no habían sido nunca determinados mediante esta técnica.

Tabla IV.3.1.- Estructuras y propiedades de los plaguicidas de estudio.

| Plaguicida (familia) | Estructura | Actividad | Mw (g/mol) | pK _a | Solubilidad en agua (mg/L, 20 °C) | DT ₅₀ típico (días) | Log K _{ow} | K _{oc} (mL/g) |
|--|--|----------------------------|---------------|-----------------|--------------------------------------|-----------------------------------|------------------------|---------------------------|
| Carbaril (carbamato) |  | Insecticida | 201,2 | 10,4 | 9,1 | 16 | 2,36 | 300 |
| Fensulfotión (OPP) |  | Insecticida, nematicida | 308,4 | - | 1540 | 30 | 2,23 | 91 |
| Mecoprop (ácido ariloxialcanoico) |  | Herbicida | 214,6 | 3,11 | 250 000 | 8,2 | 0,19 | 47 |
| Fenamifos (OPP) |  | Nematicida | 303,4 | - | 345 | 0,85 | 3,30 | 100 |
| Haloxifop (ácido ariloxifenoxipropiónico) |  | Herbicida | 361,7 | 2,90 | 1,6 | 9 | - | 75 |
| Diclofop (ácido riloxifenoxipropiónico) |  | Herbicida | 327,2 | 3,43 | 122 700 | 24 | 1,61 | - |

| | | | | | | | | |
|----------------------------|--|----------------------------|-------|---|------|-----|------|------|
| Fipronil (fenilpirazol) |  | Insecticida | 437,2 | - | 3,78 | 142 | 3,75 | - |
| Profenofos (OPP) |  | Insecticida, acaricida | 373,6 | - | 28 | 7 | 1,70 | 2016 |
| Fonofos (OPP) |  | Insecticida | 246,3 | - | 13 | 99 | 3,90 | 870 |
| Disulfotón (OPP) |  | Insecticida, acaricida | 274,4 | - | 25 | 30 | 3,95 | 1345 |
| Nitrofén (difeniléter) |  | Herbicida | 284,1 | - | 1,0 | 10 | 3,40 | - |
| Terbufos (OPP) |  | Insecticida, nematicida | 288,4 | - | 4,5 | 8 | 4,51 | 500 |

- Datos no encontrados/No aplicable. Mw: masa molecular. pKa: constante de disociación ácida. DT₅₀: tiempo de semidesintegración o vida media. K_{ow}: coeficiente de partición octanol/agua. K_{oc}: coeficiente de adsorción de carbono orgánico del suelo (FOOTPRINT, IUPAC).

Para desarrollar la separación mediante nano-LC, se empaquetaron capilares de 100 μm de d.i. con partículas de 3 μm de sílice modificada con grupos fenilo (Pinnacle II Phenyl), que ya había sido previamente utilizada para la separación de un grupo de cuatro OPPs (fensulfotión, fenamifos, profenofos y fonofos) (BUONASERA Y COLS., 2009). En el citado trabajo, se estudiaron tres fases estacionarias de sílice modificada tanto con grupos fenilo, como ciano y C_{18} . La primera mostró los mejores resultados. La Figura IV.3.1 muestra la estructura de este tipo de fase estacionaria que interacciona con compuestos que contengan grupos aromáticos o dobles enlaces a través de interacciones π - π .

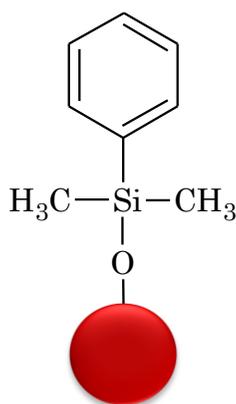


Figura IV.3.1. Estructura de la fase estacionaria de sílice modificada con grupos fenilo utilizada en este trabajo.

Tras empaquetar la columna como se indicó en la sección III.6.4, se aplicaron diversos programas de elución en modo isocrático y gradiente, utilizando mezclas agua/ACN como fases móviles, con la adición de un pequeño porcentaje de ácido fórmico en ambas (0,1% v/v). Con ello se consiguió protonar los plaguicidas ácidos (mecoprop, haloxifop y diclofop) y permitir su retención a lo largo de la columna (D'ASCENZO Y COLS., 1998; CURINI Y COLS., 2000).

La elución en régimen isocrático no resultó adecuada, debido a los largos tiempos de retención, baja eficacia y resolución. Las condiciones de separación óptimas se alcanzaron mediante el gradiente descrito en la Tabla III.2. La Figura IV.3.2 muestra un cromatograma de la separación obtenida en la que se puede apreciar claramente que el tiempo de análisis es inferior a 20 min. En este caso se inyectó un volumen de 150 nL de los plaguicidas disueltos en una mezcla 60:40 (v/v) agua/ACN.

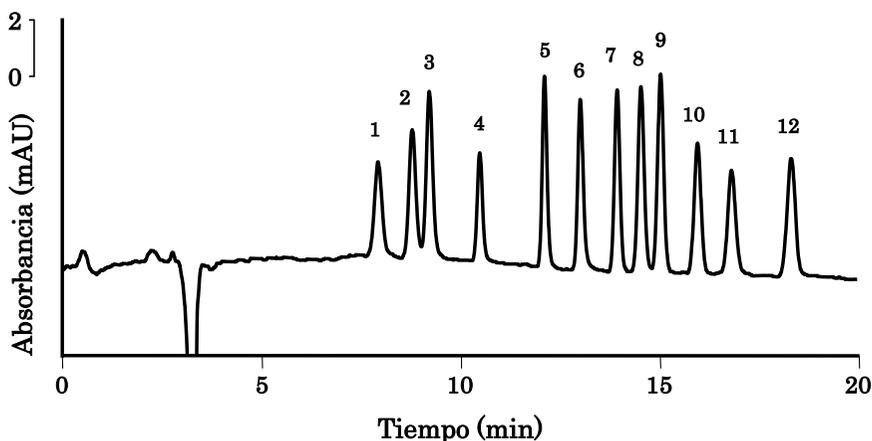


Figura IV.3.2.- Cromatograma nano-LC-UV de los analitos de interés. Volumen de inyección: 150 nL. Muestra disuelta en: 60:40 (v/v) agua/ACN. Concentración: 2,54-18,6 mg/L. Velocidad de flujo: 500 nL/min. Detección UV: 200 nm. (1) Carbaril, (2) fensulfotión, (3) mecoprop, (4) fenamifos, (5) haloxifop, (6) diclofop, (7) fipronil, (8) profenofos, (9) fonofos, (10) disulfotión, (11) nitrofen y (12) terbufos.

Los LODs instrumentales oscilaron entre 0,233 y 1,81 mg/L, valores claramente insatisfactorios para una metodología analítica encaminada al análisis de plaguicidas a nivel de trazas en muestras de agua.

IV.3.2.1.- FOCALIZACIÓN EN COLUMNA

Con el objetivo de mejorar la sensibilidad, se consideró la utilización de un procedimiento de focalización en columna, ya que en otras ocasiones había proporcionado buenos resultados (ROSALES-CONRADO Y COLS., 2005; BUONASERA Y COLS., 2009; D'ORAZIO Y FANALI, 2009). Se trata de un procedimiento simple que no requiere un equipamiento especial: la muestra se diluye en una mezcla de disolventes con una baja capacidad eluyente con respecto a la fase móvil. De este modo, los analitos quedan focalizados en la cabeza de la columna (sección I.2.2.1), incluso con el uso de elevados volúmenes de inyección.

Para estudiar el fenómeno de la focalización, se seleccionó el agua como medio de dilución de la mezcla de plaguicidas conteniendo pequeñas cantidades de ACN, dado que en algunas ocasiones la presencia de una pequeña cantidad de dicho disolvente en el medio de la muestra mejora la efectividad de la preconcentración en línea (TEGELER Y EL-RASSI, 2001; BUONASERA Y COLS., 2009). Por ello, se adicionaron porcentajes de ACN entre un 2 y un 30% (v/v), mientras que el

volumen de inyección se incrementó de 150 nL a 5 μ L. Sin embargo, se observó que bajo cualquiera de las condiciones seleccionadas, siempre se producía un solapamiento de los tres primeros picos. Con el objetivo de mejorar la resolución, se modificó el gradiente de elución, observando que con un retraso en el inicio del gradiente de 12 min, se conseguía una mejor resolución de los mismos. A continuación, y con estas nuevas condiciones, se estudió el efecto de la focalización en columna, obteniendo los cromatogramas que se muestran en la Figura IV.3.3.

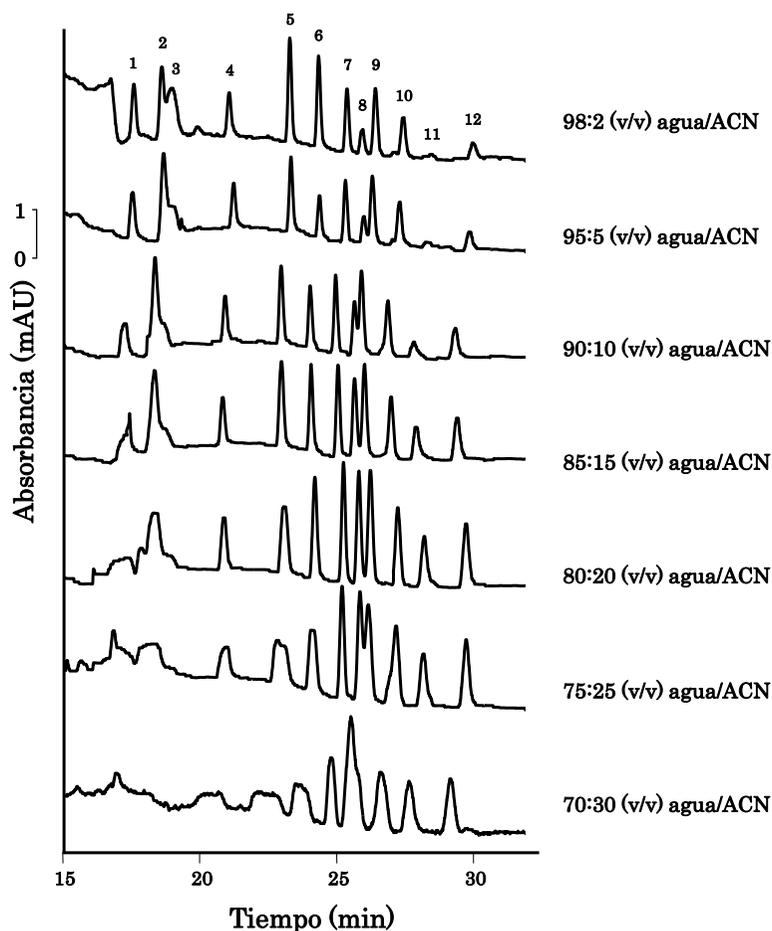


Figura IV.3.3.- Efecto de la variación del porcentaje de ACN en el disolvente de dilución de los plaguicidas para la focalización en columna. Concentración: 25-186 μ g/L. Volumen de inyección: 5 μ L. Gradiente con un retraso de 12 min respecto a la Tabla III.2. Resto de las condiciones iguales a las de la Figura IV.3.1. (1) Carbaril, (2) fensulfotión, (3) mecoprop, (4) fenamifos, (5) haloxifop, (6) diclofop, (7) fipronil, (8) profenofos, (9) fonofos, (10) disulfotón, (11) nitrofen y (12) terbufos.

Como se puede apreciar en la figura, el efecto resultó ser muy diferente dependiendo del plaguicida, dada su diferente naturaleza. El uso de un 30% (v/v) de ACN en la mezcla proporcionó eficacias inadecuadas para prácticamente todos los plaguicidas. Porcentajes más bajos de este disolvente afectaron positivamente, en términos de eficacia y área de pico mayores, para seis analitos (carbaril, fensulfotión, mecoprop, fenamifos, haloxifop y diclofop), mientras que para el resto (fipronil, profenofos, fonofos, disulfotón, nitrofén y terbufos) se obtuvieron resultados insatisfactorios.

Por otro lado, la utilización de una mezcla 85:15 (v/v) agua/ACN proporcionó los mejores resultados para todos los plaguicidas, con un incremento de los LODs de hasta 50 veces (4,01-40,0 $\mu\text{g/L}$), excepto para los tres primeros, cuya resolución y/o eficacia no resultó adecuada (ver Tabla IV.3.2). Por el contrario, el uso de una mezcla 98:2 (v/v) agua/ACN mejoró claramente la eficacia y sensibilidad de los tres primeros picos, pero afectó negativamente al resto.

En cualquier caso, la focalización en columna en este caso particular no resultó adecuada para la preconcentración simultánea y efectiva de este grupo de analitos.

IV.3.2.2. - USO DE UNA MICRO-PRECOLUMNA

Dados los malos resultados obtenidos mediante la focalización en columna, se decidió utilizar un sistema de preconcentración en 2D mediante el empleo de una micro-precolumna de 5 mm de largo, 300 μm de d.i. y 5 μm de tamaño de partícula. Ésta se colocó antes de la columna analítica, manteniendo el flujo de la fase móvil a 35 $\mu\text{L/min}$ mediante el sistema Switchos descrito en la sección III.3.3. El hecho de poder utilizar simultáneamente una micro-bomba trabajando a un flujo mayor que la nano-bomba que impulsa fase móvil a través de la columna analítica, permitió inyectar la muestra directamente en la precolumna con una reducción considerable del tiempo de carga.

Para la optimización de este método de preconcentración, se estudiaron diversos parámetros: volumen de inyección -realizada por control de tiempo- (entre 5 y 20 μL), composición del medio de la muestra (entre 50:50 (v/v)

agua/ACN y 100% de agua), composición de la fase móvil de carga para la preconcentración de los analitos (entre 90:10 (v/v) agua/ACN y 100% agua, ambos conteniendo un 0,1% (v/v) de ácido fórmico) y tiempo de inversión o tiempo durante el cual la fase móvil fue impulsada a través de la precolumna una vez que la muestra ya había sido cargada (entre 2 y 7 min).

En este sentido, el volumen de inyección se pudo incrementar hasta 20 μL sin perder resolución, mientras que el medio de la muestra resultaba adecuado para todos los analitos cuando se diluían en una mezcla 90:10 (v/v) agua/ACN. Por otra parte, se utilizó agua con un 0,1% (v/v) de ácido fórmico como fase móvil de carga, ya que la adición de tan solo un 5% (v/v) de ACN, producía una disminución drástica de las áreas de pico para todos los plaguicidas. De hecho, con un 10% (v/v), ningún plaguicida pudo ser detectado, lo que significa que incluso porcentajes de ACN muy pequeños no permitían que los analitos fueran retenidos por la precolumna. Por último, el tiempo de inversión se estableció en 4,5 min, ya que un tiempo más corto no era suficiente para eluir completamente los plaguicidas de la precolumna, mientras que tiempos más largos producían una disminución de la eficacia y tiempos de análisis más largos. La Figura IV.3.4 muestra la separación de los doce analitos de interés en las condiciones óptimas descritas anteriormente, obteniendo LODs entre 0,701 y 8,60 $\mu\text{g/L}$, excepto para disulfotón (21,0 $\mu\text{g/L}$) y terbufos (29,5 $\mu\text{g/L}$).

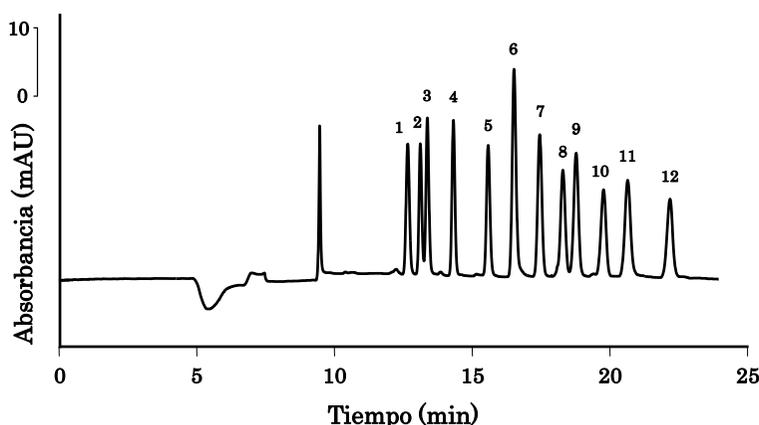


Figura IV.3.4.- Cromatograma nano-LC-UV obtenido cuando se utilizó una micro-precolumna para preconcentrar los analitos. Concentración: 87-505 $\mu\text{g/L}$. Volumen de inyección: 20 μL . Resto de las condiciones iguales a las de la Figura IV.3.1. (1) Carbaril, (2) fensulfotión, (3) mecoprop, (4) fenamifos, (5) haloxifop, (6) diclofop, (7) fipronil, (8) profenofos, (9) fonofos, (10) disulfotón, (11) nitrofen y (12) terbufos.

Como se puede apreciar en la Tabla IV.3.2, en la que se compara la sensibilidad obtenida al inyectar directamente la muestra con la alcanzada con ambas técnicas de preconcentración, los LODs obtenidos en este último caso (mediante el uso de la precolumna) son claramente inferiores a los obtenidos por inyección directa. De hecho, como se puede observar en la última columna de la tabla, el sistema en 2D con la micro-precolumna permitió mejorar los LODs entre 86 y 488 veces para prácticamente todos los plaguicidas a excepción de los dos con menor tiempo de retención (nitrofen y terbufos) para los que la mejora fue de 29 y 59 veces, respectivamente.

Tabla IV.3.2.- Comparación de los LODs obtenidos mediante inyección directa y los dos métodos de preconcentración en línea utilizados.

| | Inyección directa ^{a)} ($\mu\text{g/L}$) | Focalización en columna ^{a)} ($\mu\text{g/L}$) | Micro-precolumna ^{a)} ($\mu\text{g/L}$) | $\text{LOD}_{\text{iny. directa}} / \text{LOD}_{\text{focalización}}$ | $\text{LOD}_{\text{iny. directa}} / \text{LOD}_{\text{precolumna}}$ |
|--------------|--|--|---|---|---|
| Carbaryl | 642 | - | 1,74 | 61 | 369 |
| Fensulfotión | 591 | - | 1,21 | 63 | 488 |
| Mecoprop | 320 | - | 0,701 | 56 | 456 |
| Fenamifos | 618 | 10,2 | 1,87 | 66 | 330 |
| Haloxifop | 376 | 6,0 | 2,47 | 46 | 152 |
| Diclofop | 233 | 4,18 | 2,69 | 50 | 87 |
| Fipronil | 266 | 4,01 | 2,65 | 57 | 100 |
| Profenofos | 333 | 7,23 | 4,23 | 27 | 79 |
| Fonofos | 363 | 7,31 | 4,11 | 43 | 88 |
| Disulfotón | 1811 | 32,0 | 21,0 | 61 | 86 |
| Nitrofen | 250 | 9,14 | 8,60 | 63 | 29 |
| Terbufos | 1737 | 40,0 | 29,5 | 56 | 59 |

- Picos no integrables. a) LOD calculado como la concentración capaz de proporcionar una relación S/N de 3.

IV.3.2.3.- ESTUDIO DE REPETIBILIDAD Y CALIBRADO

Una vez optimizada la separación, se llevó a cabo un estudio de repetibilidad realizando cuatro inyecciones consecutivas ($n = 4$) en el mismo día y en tres días diferentes ($n = 12$) de una mezcla de los analitos a dos niveles de concentración diferentes (entre 10-300 $\mu\text{g/L}$ el primero y 20-700 $\mu\text{g/L}$ el segundo). A continuación, se realizó el calibrado instrumental basado en las áreas de pico, inyectando siete niveles de concentración diferentes por triplicado ($n = 7$). Los resultados de estos estudios se muestran en la Tabla IV.3.3.

Tabla IV.3.3.- Estudio de repetibilidad y calibrado instrumental del método nano-LC-UV desarrollado.

| Analito | Precisión en el mismo día ($n = 4$) | | Precisión entre días ($n = 12$, tres días) | | Rango lineal ($\mu\text{g/L}$) | $b \pm t S_b$ | $a \pm t S_a$ | R^2 | LOD ^{a)} ($\mu\text{g/L}$) |
|--------------|---------------------------------------|----------|--|----------|----------------------------------|-----------------|--------------------|-------|---------------------------------------|
| | t_r | A | t_r | A | | | | | |
| | (RSD, %) | (RSD, %) | (RSD, %) | (RSD, %) | | | | | |
| Cabaryl | 0,3 | 3,8 | 0,4 | 5,6 | 9-370 | $18,1 \pm 0,7$ | $0,024 \pm 0,123$ | 0,999 | 1,74 |
| Fensulfotión | 0,3 | 4,8 | 0,5 | 5,8 | 6-220 | $20,9 \pm 1,0$ | $-0,092 \pm 0,102$ | 0,998 | 1,21 |
| Mecoprop | 0,3 | 4,9 | 0,5 | 5,5 | 4-140 | $38,0 \pm 2,0$ | $-0,100 \pm 0,135$ | 0,998 | 0,70 |
| Fenamifos | 0,3 | 5,8 | 0,5 | 4,6 | 10-420 | $14,1 \pm 0,5$ | $-0,077 \pm 0,109$ | 0,999 | 1,87 |
| Haloxifop | 0,5 | 7,0 | 0,6 | 5,4 | 11-450 | $12,9 \pm 0,7$ | $-0,073 \pm 0,154$ | 0,998 | 2,47 |
| Diclofop | 0,5 | 6,6 | 0,7 | 6,1 | 11-460 | $15,1 \pm 0,9$ | $-0,207 \pm 0,207$ | 0,997 | 2,69 |
| Fipronil | 0,6 | 5,4 | 0,7 | 5,5 | 15-590 | $14,0 \pm 1,1$ | $-0,026 \pm 0,316$ | 0,995 | 2,65 |
| Profenofos | 0,5 | 5,3 | 0,8 | 6,4 | 22-890 | $10,2 \pm 0,8$ | $-0,150 \pm 0,359$ | 0,995 | 4,23 |
| Fonofos | 0,6 | 6,7 | 0,8 | 5,6 | 22-890 | $9,15 \pm 0,81$ | $0,071 \pm 0,345$ | 0,994 | 4,11 |
| Disulfotón | 0,6 | 6,1 | 0,8 | 5,4 | 86-3450 | $2,05 \pm 0,16$ | $0,021 \pm 0,273$ | 0,995 | 21,0 |
| Nitrofén | 0,6 | 9,7 | 0,9 | 8,6 | 42-1690 | $5,73 \pm 0,23$ | $0,199 \pm 0,183$ | 0,999 | 8,60 |
| Terbufos | 0,6 | 5,6 | 0,9 | 7,1 | 133-5320 | $1,37 \pm 0,04$ | $0,001 \pm 0,094$ | 0,999 | 29,5 |

a) Calculado como la concentración capaz de proporcionar una relación S/N de 3. 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^2 : coeficiente de determinación ($n = 7$).

Como se puede observar en la tabla, se obtuvo una buena repetibilidad dentro del mismo día con RSDs entre 0,3 y 0,6% para los tiempos de retención y entre 3,8 y 9,7% para las áreas de pico. Entre días, éstas oscilaron entre 0,4 y 0,9% y 4,6 y 8,6%, respectivamente. Además, se obtuvo buena linealidad, con coeficientes de determinación (R^2) por encima de 0,994 para todos los plaguicidas. Se obtuvieron LODs, calculados como la concentración que proporcionaba una relación S/N de 3, entre 0,70 y 8,60 $\mu\text{g/L}$, excepto para disulfotón (21,0 $\mu\text{g/L}$) y terbufos (29,5 $\mu\text{g/L}$). En general, estos resultados indicaron una buena repetibilidad del modo de inyección utilizado.

IV.3.3.- PROCEDIMIENTO DE dSPE UTILIZANDO MWCNTs

Tal como se comentó en los antecedentes, los MWCNTs habían sido ampliamente utilizados para la extracción de diferentes analitos orgánicos mediante SPE convencional. Por otra parte, de los plaguicidas seleccionados, sólo fenamifos (RAVELO-PÉREZ Y COLS., 2008a, 2008b) y disulfotón (BASHEER Y COLS., 2006) habían sido previamente extraídos con CNTs.

Una vez optimizada la separación por nano-LC, así como la correspondiente preconcentración en línea utilizado el sistema en 2D, se optimizó un procedimiento de dSPE utilizando MWCNTs de 10-15 nm de d.e., 2-6 nm de d.i. y 0,1-10 μm de longitud. Estos CNTs son los mismos que se han utilizado en las dos primeras secciones de este capítulo, ya que se trata de materiales económicos a la vez que efectivos para la extracción de plaguicidas (RAVELO-PÉREZ Y COLS., 2008a, 2008b).

Tal como se describe al final de la sección III.6.4., para llevar a cabo el procedimiento de dSPE, se introdujo la cantidad apropiada de MWCNTs en un matraz que contenía la muestra acuosa enriquecida con los analitos de interés. Después de agitar mecánicamente durante un cierto tiempo, la fase estacionaria fue transferida a una columna de vidrio que contenía en el fondo dos fritados de PTFE y, tras haber traspasado toda la fase estacionaria del matraz a la columna, se completó el empaquetado de la misma añadiendo otro fritado en la parte superior. Posteriormente, se secó a vacío y se realizó la elución. La principal ventaja de este procedimiento es que supone un ahorro considerable de tiempo con respecto a la forma convencional de llevar a cabo la SPE (preparación

de la columna empacotada, activación, carga de la muestra y elución).

Los parámetros que afectan a la extracción, como el tipo y volumen de disolvente de elución, tiempo de extracción, pH de la muestra acuosa y cantidad de fase estacionaria, se optimizaron paso a paso, tal como se muestra a continuación.

IV.3.3.1.- SELECCIÓN DEL DISOLVENTE DE ELUCIÓN

Los experimentos iniciales se llevaron a cabo por duplicado utilizando 50 mg de los MWCNTs seleccionados para extraer 100 mL de agua Milli-Q a pH 2,5, enriquecida a una concentración entre 0,431-16,0 $\mu\text{g/L}$ de los plaguicidas. Inicialmente se fijó un pH tan bajo para tratar de facilitar la retención de los tres plaguicidas ácidos (diclofop, haloxifop y mecoprop). Se estudiaron diferentes disolventes de elución (DCM, MeOH, ACN, acetona y *n*-hexano), utilizando un volumen de 25 mL en cada caso. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura IV.3.5.

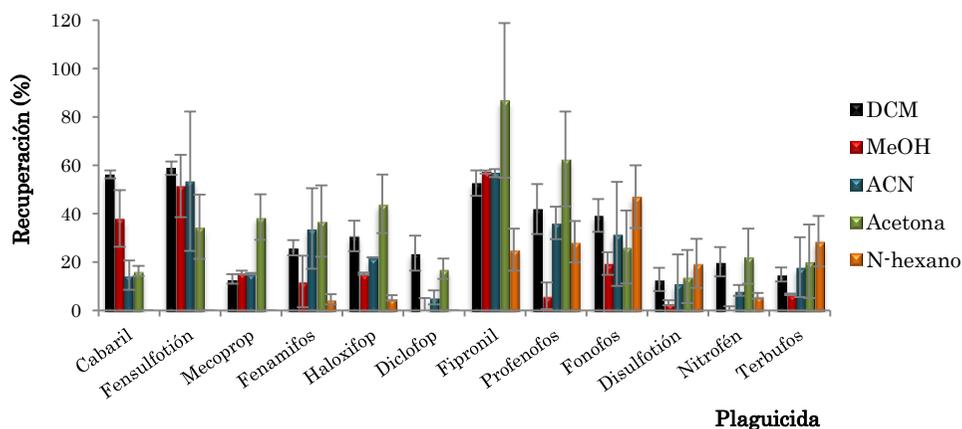


Figura IV.3.5.- Efecto de la variación del disolvente de elución en las recuperaciones de los plaguicidas en estudio ($n = 2$). Las barras de error representan la desviación estándar. Concentración: 0,431-15,9 $\mu\text{g/L}$. Condiciones de extracción: 100 mL de agua Milli-Q a pH 2,5, 50 mg de MWCNTs, 20 min de tiempo de extracción y elución con 25 mL de disolvente.

En general, el DCM y la acetona resultaron ser los disolventes de extracción más efectivos, con porcentajes de recuperación entre 13 y 60%, y 16 y 87%, respectivamente. El resto de los disolventes (MeOH, ACN y *n*-hexano) proporcionaron recuperaciones inferiores. De hecho, el *n*-hexano no consiguió

eluir a carbaril, fensulfotión, mecoprop y diclofop. En lo que a la repetibilidad entre extracciones se refiere, es importante destacar que cuando se utilizó la acetona, ésta resultó no ser satisfactoria (RSDs por encima del 20%, incluso con un elevado número de extracciones), un hecho que ya había sido previamente observado en el trabajo presentado en la sección IV.2 de la presente Tesis Doctoral, en el que se utilizó el mismo tipo de CNTs. Por ello, se seleccionó finalmente el DCM, que es sin duda alguna uno de los disolventes más utilizados en multitud de trabajos ya publicados sobre la extracción de plaguicidas de las mismas familias (RAVELO-PÉREZ Y COLS., 2008a, 2008b).

IV.3.3.2.- SELECCIÓN DEL TIEMPO DE EXTRACCIÓN

Este modo de llevar a cabo la SPE requiere el estudio del tiempo de extracción, es decir, el tiempo que la fase estacionaria permanece en contacto con la muestra que contiene los analitos. Como era de esperar, las recuperaciones aumentaron con un incremento del tiempo de extracción, que fue estudiado entre 0 y 25 min. Sin embargo, tiempos superiores a 15 min (que proporcionó recuperaciones entre 13 y 60%) no producían una mejora de la eficacia de la extracción. Por ello, se continuó realizando las extracciones fijando un tiempo de contacto de 15 min.

IV.3.3.3.- SELECCIÓN DEL pH DE LA MUESTRA ACUOSA

El control del pH es un parámetro crítico para obtener una buena eficacia de extracción, ya que determina si los analitos se encuentran como moléculas neutras o iónicas, influenciando, por tanto, el grado de interacción del analito con la fase estacionaria. Para evaluar este parámetro, se realizaron extracciones a diferentes valores de pH, entre 2 y 5. Los resultados se muestran en la Figura IV.3.6.

Como se puede apreciar, se observó una disminución drástica de la recuperación para los plaguicidas ácidos (diclofop, haloxifop y mecoprop), cuando el pH se ajustó por encima de su valor de pK_a (Tabla IV.3.1). De hecho, a pH 5,0, ninguno de ellos era retenido por los MWCNTs. Para el resto de los analitos, se observó un ligero incremento de las recuperaciones hasta pH 4,0, disminuyendo de nuevo a valores de pH superiores.

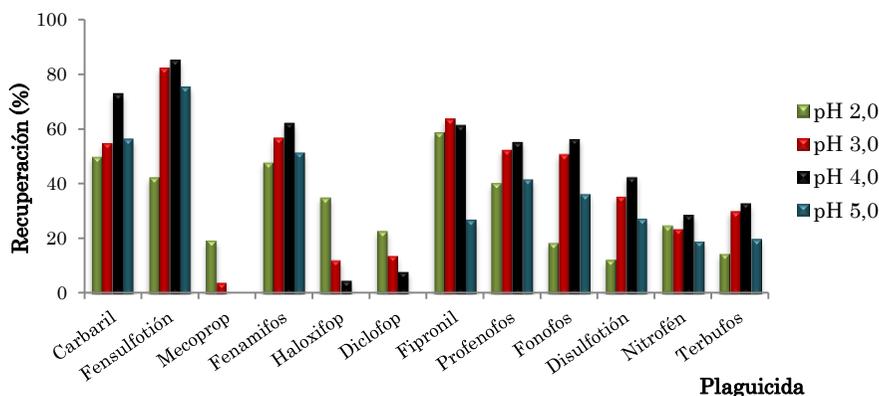


Figura IV.3.6.- Efecto de la variación del pH de la muestra acuosa en las recuperaciones de los doce plaguicidas en estudio. Concentración: 0,431-15,9 $\mu\text{g/L}$. Condiciones de extracción: 100 mL de agua Milli-Q, 50 mg de MWCNTs, 15 min de tiempo de extracción y elución con 25 mL de DCM.

Con el objetivo de seleccionar un valor de compromiso para todos los plaguicidas (ácidos y no ácidos), se seleccionó un pH de 3,0. El uso de pH más bajos (hasta 1,0) no mejoró las recuperaciones de los plaguicidas ácidos, y además, afectó negativamente a la extracción del resto de analitos.

IV.3.3.4.- SELECCIÓN DE LA CANTIDAD DE MWCNTS

La cantidad de fase estacionaria utilizada se estudió con el objetivo de emplear la menor cantidad posible para obtener la mayor eficacia de extracción. La cantidad de CNTs se varió entre 30 y 100 mg, obteniendo los resultados presentados en la Figura IV.3.7.

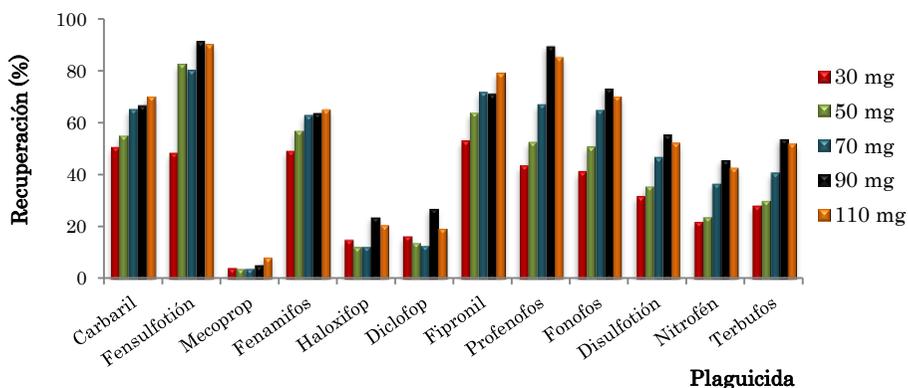


Figura IV.3.7.- Efecto de la variación de la cantidad de MWCNTs en las recuperaciones de los doce plaguicidas en estudio. Concentración: 0,431-15,9 $\mu\text{g/L}$. Condiciones de extracción: 100 mL de agua Milli-Q a pH 3,0, 15 min de tiempo de extracción y elución con 25 mL de DCM.

Pequeñas cantidades de CNTs, como 30 mg, proporcionaron recuperaciones bajas (22-53%) debido a una retención insuficiente de los analitos, mientras que cantidades iguales o superiores a 90 mg resultaron en porcentajes de recuperación más elevados (46-91%), excepto para los plaguicidas ácidos, para los que los valores fueron inferiores al 27% en todos los casos. Por ello, se seleccionó esta cantidad de MWCNTs como óptima.

IV.3.3.5.- SELECCIÓN DEL VOLUMEN DE DISOLVENTE DE ELUCIÓN

Finalmente, se realizaron diferentes extracciones utilizando volúmenes de DCM entre 10 y 45 mL. Los resultados indicaron que las recuperaciones eran máximas cuando se utilizaba un volumen de 35 mL. En este caso, los porcentajes de recuperación oscilaron entre 64 y 107% para todos los plaguicidas, excepto para disulfotón, nitrofen y terbufos (33-47%) y mecoprop, haloxifop y diclofop (<20%).

Con el objetivo de mejorar las recuperaciones, especialmente para los plaguicidas ácidos, se llevaron a cabo diversos experimentos. En este sentido, se estudió la elución con mezclas de disolventes (DCM/ACN, DCM/MeOH, etc.) así como la elución consecutiva con diferentes disolventes, sin obtener éxito alguno. Incluso la adición de diferentes modificadores como el ácido fórmico o incluso el amoníaco, tal como se había sugerido en trabajos anteriores para la SPE de plaguicidas del mismo tipo (LAGANÀ Y COLS., 1998; BIESAGA Y PYRZYNSKA, 2006), no mejoró los resultados obtenidos hasta el momento.

Los estudios realizados parecen indicar que los resultados obtenidos para algunos de los plaguicidas seleccionados, especialmente los ácidos, para los que no existían estudios previos de CNTs-SPE, están originados por una retención insuficiente por parte de este tipo de MWCNTs, y no por una elución incompleta. A pesar de los esfuerzos realizados para mejorar los porcentajes de recuperación de mecoprop, haloxifop y diclofop no fue posible mejorar la eficacia de la extracción. De hecho, el trabajar con un grupo de analitos con propiedades fisicoquímicas tan diferentes (pK_a , K_{ow} , etc.), intentando seleccionar las mejores condiciones de extracción para todos ellos, no es una tarea fácil. En algunas ocasiones como ésta, no es posible realizar la extracción simultánea de todos los analitos. Por esta razón, se decidió excluir estos tres plaguicidas del estudio, así

como modificar el valor óptimo de pH a 4,0 para el resto de los plaguicidas (ver Figura IV.3.5), dado que había proporcionado buenos resultados.

IV.3.3.6.- COMPARACIÓN CON LA SPE CONVENCIONAL

Para comprobar que estos bajos porcentajes de recuperación para algunos de los plaguicidas no se debían al modo de llevar a cabo el procedimiento de SPE (modo dispersivo), se realizaron algunas experiencias en las condiciones previamente optimizadas, pero realizando la SPE en modo convencional. Para ello, se empaquetaron 90 mg de MWCNTs en una columna, en el mismo modo descrito en las secciones III.6.2 y III.6.3 de esta Tesis Doctoral, llevando a cabo el mismo protocolo de activación (10 mL de ACN y 10 mL de agua Milli-Q). Una alícuota de 100 mL de agua Milli-Q enriquecida a pH 4,0 se pasó a través del cartucho activado, se secó a vacío y se eluyó con 25 mL de DCM. Los resultados se muestran en la Figura IV.3.8.

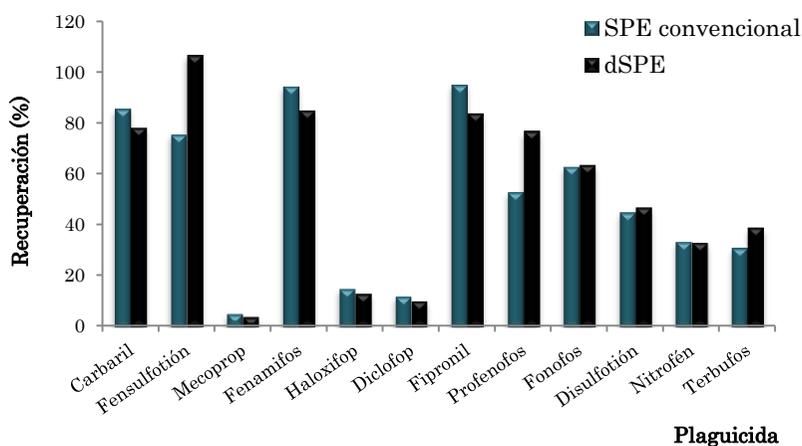


Figura IV.3.8.- Comparación de las recuperaciones obtenidas cuando el procedimiento de SPE se llevó a cabo en modo convencional y dispersivo. Concentración: 0,431-15,9 $\mu\text{g/L}$. Condiciones de extracción (SPE convencional): 100 mL de agua Milli-Q a pH 4,0, 90 mg de MWCNTs, activación con 10 mL de ACN y 10 mL de agua Milli-Q, elución con 25 mL de disolvente. Condiciones de extracción (dSPE): 100 mL de agua Milli-Q a pH 4,0, 90 mg de MWCNTs, 15 min de tiempo de extracción y elución con 25 mL de DCM.

Prácticamente, se obtuvieron los mismos porcentajes de recuperación para todos los plaguicidas, entre 33-107% para la dSPE y entre 31-95% para la convencional, excluyendo mecocrop, haloxifop y diclofop. Incluso, estos últimos tampoco se extrajeron cuantitativamente en el modo convencional, lo que

confirma la fiabilidad del modo dispersivo. En el caso de fensulfotión y profenofos, las recuperaciones fueron ligeramente más altas en el modo dispersivo. Por otra parte, hay que tener en cuenta que la utilización de la dSPE supone una clara ventaja frente al uso de la SPE convencional dado que se consigue un considerable ahorro de tiempo, lo que puede ser de gran utilidad, sobre todo cuando el volumen de agua a extraer sea más alto.

IV.3.3.7.- REUTILIZACIÓN DE LOS MWCNTS

A continuación, también se estudió la posible reutilización de los CNTs, con el objetivo de disminuir el gasto de fase estacionaria por extracción. En la bibliografía, y hasta el momento de la realización de la presente Tesis Doctoral, el número de trabajos en los que se prestaba atención a esta cuestión era muy reducido (LIANG Y COLS., 2004, 2005, 2008; ZHOU Y COLS., 2007a; LÓPEZ-FERIA Y COLS., 2009; BASHEER Y COLS., 2009; WU Y COLS., 2011). La mayoría de estas aplicaciones se desarrollaron para la extracción de iones inorgánicos de aguas (LIANG Y COLS., 2004, 2005, 2008; WU Y COLS., 2011) y, en menor medida, para la extracción de analitos orgánicos como plaguicidas de aceite de oliva (LÓPEZ-FERIA Y COLS., 2009), agua (ZHOU Y COLS., 2007a) o suelos (BASHEER Y COLS., 2006).

En este caso particular, después de realizar varias extracciones consecutivas con la misma cantidad de CNTs, se pudo observar que era necesario realizar un lavado exhaustivo al final de cada extracción antes de comenzar una nueva, tal como habían sugerido diversos trabajos previos (LIANG Y COLS., 2004, 2005, 2008; ZHOU Y COLS., 2007a; LÓPEZ-FERIA Y COLS., 2009; BASHEER Y COLS., 2009; WU Y COLS., 2011).

Las condiciones de lavado óptimas incluyeron el uso de 5 mL de ACN y 5 mL de DCM, así como un secado a vacío antes de su reutilización. Esto permitía poder realizar hasta 5 extracciones consecutivas sin pérdidas de recuperación. En la bibliografía se describen protocolos de lavado similares aunque con otros tipos de CNTs. Por ejemplo, López-Feria y cols. (2009) lavaron 30 mg de SWCNTs carboxilados con los que rellenaron el cartucho de SPE con 3 mL de MeOH entre extracciones, mientras que Zhou y cols. (2007a) utilizaron MeOH y agua (10 mL de cada uno) para 100 mg de MWCNTs. En estos dos trabajos, los CNTs pudieron reutilizarse más de 100 y 200 veces, respectivamente. Basheer y cols.

(2009) introdujeron un lavado con ACN para 6 mg de MWCNTs empaquetados en el interior de una membrana de PP, aunque el volumen de disolvente y el número de veces que se podía reutilizar no se indicó en el trabajo. Sin embargo, al extraer analitos inorgánicos, se realizaba un lavado con 10 mL de HNO₃ o HCl diluido, seguidos de 20 mL de agua (LIANG Y COLS., 2004, 2005, 2008; WU Y COLS., 2011).

Aunque el tipo de CNTs que se utilizó en este trabajo no resulta costoso, la posibilidad de reutilizar este material hasta cinco veces eleva el interés de su uso para el procedimiento de dSPE propuesto.

IV.3.3.8.- ESTUDIO DE RECUPERACIONES

La repetibilidad del método MWCNTs-dSPE-nano-LC-UV desarrollado se evaluó llevando a cabo un estudio de recuperaciones a tres niveles de concentración diferentes utilizando agua Milli-Q con cuatro extracciones para cada nivel ($n = 4$). En todos los casos se obtuvieron resultados satisfactorios, como se muestra en la Tabla IV.3.4.

Tabla IV.3.4.- Valores de recuperación promedio (% R), de RSD y concentración (Conc.) de plaguicida añadida a la muestra tras aplicar el método MWCNTs-dSPE-nano-LC-UV.

| Plaguicida | Nivel 1 | | Nivel 2 | | Nivel 3 | | LOD (µg/L) |
|--------------|-------------------------------|-----------------|-------------------------------|-----------------|-------------------------------|-----------------|---------------|
| | % R ^{a)} (RSD, %) | Conc. (µg/L) | % R ^{a)} (RSD, %) | Conc. (µg/L) | % R ^{a)} (RSD, %) | Conc. (µg/L) | |
| Cabaril | 99 (6) | 0,561 | 92 (13) | 1,11 | 98 (8) | 1,68 | 0,02 |
| Fensulfotión | 83 (8) | 0,330 | 102 (5) | 0,681 | 83 (4) | 1,00 | 0,02 |
| Mecoprop | 87 (16) | 0,623 | 83 (8) | 1,26 | 78 (9) | 1,87 | 0,03 |
| Fenamifos | 101 (12) | 0,891 | 85 (14) | 1,78 | 81 (7) | 2,66 | 0,04 |
| Haloxifop | 64 (13) | 1,32 | 54 (9) | 2,66 | 52 (12) | 3,98 | 0,09 |
| Diclofop | 79 (15) | 1,34 | 71 (6) | 2,67 | 71 (7) | 4,01 | 0,07 |
| Fipronil | 63 (8) | 5,18 | 51 (6) | 10,4 | 58 (17) | 15,5 | 0,44 |
| Profenofos | 43 (15) | 2,54 | 40 (8) | 5,08 | 36 (5) | 7,62 | 0,26 |
| Fonofos | 45 (16) | 7,99 | 38 (10) | 16,0 | 38 (6) | 24,0 | 0,87 |

a) Media de cuatro extracciones ($n = 4$), 100 mL agua Milli-Q.

Como se ha mencionado previamente, estos bajos valores de recuperación para algunos de los plaguicidas se pueden atribuir a una extracción incompleta con este tipo de CNTs ya que, diferentes disolventes, así como mezclas de ellos o

volúmenes más elevados no proporcionaron mejores resultados. Además, y con fines comparativos, se realizaron diversas extracciones con un cartucho de SPE comercial del tipo C₁₈ (Sep-Pak Vac) como se indica en la sección III.6.4 de la presente Tesis Doctoral, previamente utilizado en la bibliografía para la extracción de fensulfotión, fenamifos, profenofos y fonofos (BUONASERA Y COLS., 2009), obteniendo porcentajes de recuperación similares (en el rango 36-100%). En general, las recuperaciones obtenidas son comparables a las obtenidas en otros trabajos en los que se utilizan otras fases estacionarias en SPE para la determinación de OPPs en aguas (TANKIEWICZ Y COLS., 2010).

Los LODs oscilaron entre 0,016 y 0,089 µg/L para todos los plaguicidas, valores que están por debajo de los LMRs establecidos por la UE, excepto para disulfotón, nitrofen y terbufos, que oscilaron entre 0,259 y 0,873 µg/L. La Figura IV.3.9 muestra el cromatograma obtenido para una de las muestras de agua analizadas.

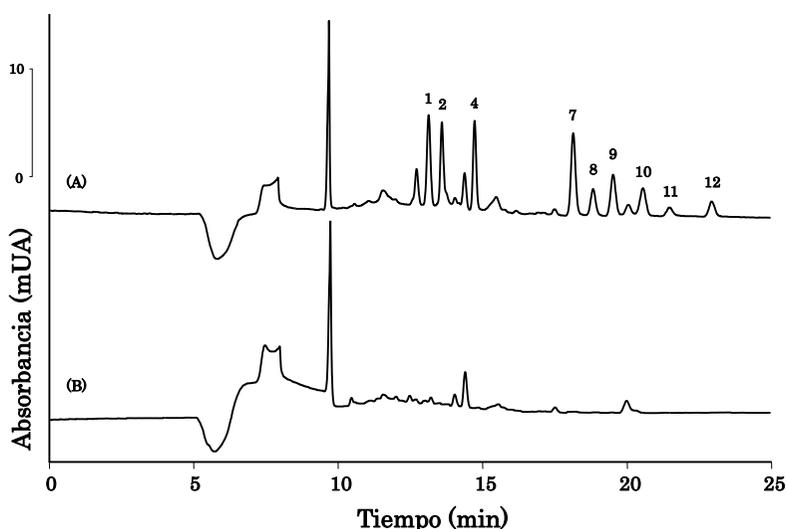


Figura IV.3.9.- Cromatograma nano-LC-UV correspondiente a la extracción mediante MWCNTs-dSPE de una muestra de agua Milli-Q (A) enriquecida y (B) no enriquecida. Concentración: 0,431-15,9 µg/L. Condiciones de extracción: 100 mL de agua Milli-Q a pH 4,0, 90 mg de MWCNTs, 15 min de tiempo de extracción y elución con 25 mL de DCM. (1) Carbaril, (2) fensulfotión, (4) fenamifos, (7) fipronil, (8) profenofos, (9) fonofos, (10) disulfotón, (11) nitrofen y (12) terbufos.

Considerando los trabajos previamente publicados en los que se utilizó la SPE convencional con CNTs para la extracción de algunos plaguicidas incluidos en este estudio, en el trabajo de Ravelo-Pérez y cols. (2008b), el fenamifos se

extrajo de 800 mL de diferentes tipos de aguas y se analizó mediante GC-NPD, obteniendo una recuperación en agua Milli-Q del 64% y un LOD de 0,045 µg/L. Estos datos son comparables a los obtenidos en el presente trabajo (aunque con un LOD ligeramente superior y una recuperación más baja), en los que sólo 100 mL de agua Milli-Q proporcionaron una recuperación del 83% y un LOD de 0,027 µg/L. Por otra parte, Basheer y cols. (2009) extrajeron disulfotón de muestras de suelo mediante CNTs-µ-SPE, obteniendo un LOD de 5 pg/g. Sin embargo, no se indicaron los valores de las recuperaciones absolutas obtenidas.

Es importante destacar que hasta el momento no se había descrito la extracción de la mayoría de los plaguicidas seleccionados en este estudio con CNTs, tampoco en el modo dSPE. Por tanto, estos resultados constituyen un punto de partida para el desarrollo de metodologías que empleen estos nuevos materiales (incluyendo su reutilización), tanto en el modo dispersivo como en el convencional (si así se prefiere), para la extracción de plaguicidas de familias diferentes, así como de otros analitos y matrices.

IV.3.4.- CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en esta sección, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- Se optimizó la separación mediante nano-LC de un grupo de doce plaguicidas (carbaril, fensulfotión, mecoprop, fenamifos, haloxifop, diclofop, fipronil, profenofos, fonofos, disulfotón, nitrofén y terbufos) con detección UV. Al realizar una inyección directa, se alcanzaron LODs comprendidos entre 0,233 y 1,81 mg/L.
- Dado que los LODs obtenidos con inyección directa no resultaron satisfactorios, se empleó la focalización en columna. Sin embargo, no se consiguió llegar a una situación de compromiso para todos los analitos, ya que en las mejores condiciones, la resolución no era completa para carbaril, fensulfotión y mecoprop. Para el resto de los analitos, se obtuvieron LODs entre 4,01 y 40,0 µg/L, valores que supusieron mejoras de hasta 50 veces con respecto a los LODs obtenidos por inyección directa.
- Una vez desechada la focalización en columna, se estudió el empleo de un

sistema en 2D con una micro-precolumna. Tras optimizar los correspondientes parámetros, finalmente se alcanzaron LODs entre 0,701 y 29,5 µg/L. Esto supuso una mejora de la sensibilidad de casi 500 veces en algunos casos.

- Se optimizó un procedimiento de SPE en modo dispersivo empleando MWCNTs que supone una reducción importante del tiempo de extracción y simplifica el procedimiento convencional. Se obtuvieron resultados satisfactorios para la extracción de nueve de los doce plaguicidas (carbaril, fensulfotión, fenamifos, fipronil, fonofos, profenofos, disulfotón, nitrofén y terbufos) de agua Milli-Q, alcanzando recuperaciones entre el 71 y el 102% para la mayoría de ellos. Profenofos, disulfotón, nitrofén y terbufos se extrajeron entre el 36 y el 64%, mientras que haloxifop, mecoprop y diclofop, los tres plaguicidas ácidos del grupo seleccionado, no fueron suficientemente retenidos por este tipo de CNTs y se excluyeron del estudio. En todos los casos, se obtuvieron RSDs inferiores al 17%. Los MWCNTs se pudieron reutilizar hasta cinco veces para realizar extracciones consecutivas, realizando entre cada una de ellas un breve lavado con ACN y DCM.
- Los resultados obtenidos constituyen un punto de partida para el desarrollo de nuevas metodologías que empleen CNTs como fases estacionaras para SPE en el modo dispersivo tanto para la extracción de plaguicidas de otras familias, así como de otros analitos y de diferentes matrices.

IV.4.- EVALUACIÓN DEL MÉTODO QuEChERS MODIFICADO PARA LA EXTRACCIÓN DE PLAGUICIDAS DE DIFERENTES TIPOS DE SUELO

En esta sección se ha estudiado la aplicación del método QuEChERS previamente modificado para la determinación de un grupo de diez OPPs (etoprofos, dimetoato, diazinón, malaoxón, metil-clorpirifos, fenitrotión, malatión, clorpirifos, fenamifos y fosmet) y una tiadiazina (buprofezín) en tres tipos de suelo (forestal, ornamental y agrícola) con propiedades fisicoquímicas diferentes. La metodología se validó mediante estudios de calibración, recuperación, precisión y exactitud, realizando el análisis mediante GC-NPD y obteniendo LODs en el rango de los ng/g. El método se aplicó finalmente para la determinación de clorpirifos en un suelo tratado con dicho plaguicida para el cultivo de la papa. La presencia del mismo se confirmó mediante GC-MS. La metodología desarrollada constituye el primer trabajo en el que este grupo de plaguicidas es extraído de muestras de suelo (excepto clorpirifos y metil-cloripifos) mediante el método QuEChERS, así como la primera vez que se lleva a cabo un estudio del efecto matriz para este método y tipo de muestras.

IV.4.1.- ANTECEDENTES

Tal como se comentó en el Capítulo I, el método QuEChERS se ha aplicado, sobre todo, para el análisis de plaguicidas en frutas y verduras. De hecho, éste es el campo de aplicación para el que inicialmente fue concebido. Sin embargo, con posterioridad, y en el momento de la realización del presente trabajo, ya había sido también utilizado para la extracción de este tipo de analitos de otros alimentos como cereales (NGUYEN Y COLS., 2007, 2008; WALORCZYK, 2007, 2008; KOESUKWIWAT Y COLS., 2008), preparados infantiles a base de carne (PRZYBYLSKI Y COLS., 2009), leche (LEHOTAY Y COLS., 2005b; KEEGAN Y COLS., 2009) y hierbas medicinales (NGUYEN Y COLS., 2009), además de para la extracción de otros analitos diferentes, como fármacos de uso veterinario de leche (AGUILERA-LUIZ Y COLS., 2008; KINSELLA Y COLS., 2009), hígado (KINSELLA Y COLS., 2009) y sangre de cerdo (PLOSSL Y COLS., 2006) o de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) de pescado (RAMALHOSA Y COLS., 2009). En la mayoría de los casos, su aplicación se llevó a cabo bajo las condiciones inicialmente desarrolladas (sección I.3.2.1).

A pesar de que este método proporciona buenos resultados para la

extracción de plaguicidas de diferente polaridad de alimentos, se hace interesante establecer si es también útil para su extracción de otro tipo de muestras más complejas como, por ejemplo, los suelos, en las que la presencia de plaguicidas es bastante habitual. En este sentido, el método QuEChERS sólo se había aplicado para la extracción de plaguicidas de suelos en cuatro ocasiones (LESUEUR Y COLS., 2008; CHEN Y COLS., 2009; DROŹDZYŃSKI Y KOWALSKA, 2009; DONG Y COLS., 2009), utilizando en todos los casos detección por MS. Sin embargo, en tres de estos trabajos (CHEN Y COLS., 2009; DROŹDZYŃSKI Y KOWALSKA, 2009; DONG Y COLS., 2009), el número de plaguicidas analizados fue muy pequeño. En particular, Chen y cols. (2009) habían desarrollado una modificación del método QuEChERS para el análisis mediante GC-MS de un solo plaguicida, procimidona, para estudiar su disipación, obteniendo porcentajes de recuperación entre el 83 y el 93%, así como un LOD de 1,65 ng/g. Dicha modificación consistió en la adición de 3 mL de agua, 10 mL de ACN y 2 g de NaCl a 10 g de suelo en la primera etapa, para luego llevar a cabo la etapa de dSPE tomando 1 mL de sobrenadante y adicionando 50 mg de PSA y 250 mg de MgSO₄ anhidro. Por otra parte, Drożdżyński y Kowalska (2009) habían determinado sólo tres plaguicidas, azadiractina, spinosad y rotenona, en suelos mediante QuEChERS-UPLC-MS con recuperaciones entre el 83 y el 104% y LODs entre 1,8 y 2,7 ng/g. En este caso el método aplicado consistió en tomar 5 g de suelo y agregar 25 mL de agua, 10 mL de ACN, 4 g de MgSO₄ anhidro, 1 g de NaCl, 1 g de citrato trisódico dihidratado y 0,5 g de hidrogenocitrato disódico sesquihidratado. La etapa de dSPE se realizó tomando 5 mL de sobrenadante, 150 mg de PSA y 900 mg de MgSO₄. Por último, Dong y cols. (2009) habían analizado metaflumizona mediante QuEChERS-UPLC-MS/MS, obteniendo recuperaciones entre el 78 y el 85% y 1 ng/g como LOD. En este caso, se añadieron 5 mL de agua, 10 mL de ACN, 4 g de MgSO₄ anhidro y 1 g de NaCl a 10 g de suelo, y se tomó 1 mL de sobrenadante, al que se le adicionaron 30 mg de PSA y 200 mg de MgSO₄ anhidro. Sólo en una ocasión, se habían determinado veinticuatro plaguicidas de diferentes familias, doce mediante GC-MS y doce mediante HPLC-MS/MS (LESUEUR Y COLS., 2008). Sin embargo, el objetivo de este último trabajo era comparar la eficacia de distintos métodos de extracción como la UAE, la extracción con líquidos presurizados (PLE), la Norma DIN 12393 para alimentos (extracción con acetona, partición líquido-líquido con acetato de etilo/ciclohexano y limpieza mediante cromatografía de permeación en gel) y el método QuEChERS, más que para estudiar en profundidad la aplicación del último. De hecho, para algunos de los

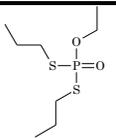
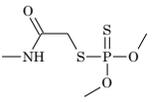
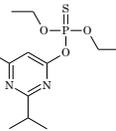
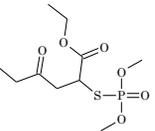
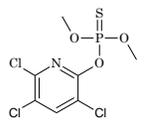
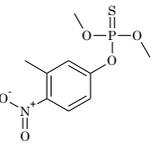
plaguicidas se hacía evidente la necesidad de estudiar un posible efecto matriz, ya que se obtenían porcentajes de recuperación superiores al 120% en algunos casos. En lo que respecta al método QuEChERS utilizado, 10 g de suelo fueron extraídos con 20 mL de ACN, 4 g de MgSO₄ anhidro, 1 g de NaCl, 1 g de citrato trisódico dihidratado y 0,5 g de hidrogenocitrato disódico sesquihidratado. Posteriormente, se realizó la etapa de dSPE tratando todo el sobrenadante con 150 mg de PSA y 950 mg de MgSO₄ anhidro, obteniendo porcentajes de recuperación entre el 27 y el 121% y LODs entre 0,02 y 88 ng/g.

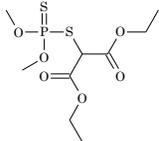
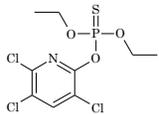
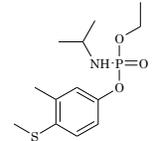
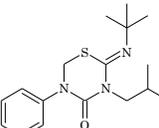
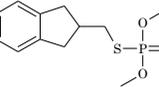
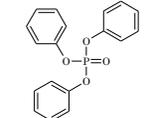
Dado el creciente interés que ha despertado este método en los últimos años, tanto para el análisis de plaguicidas de muestras de diferente naturaleza como de otro tipo de analitos, resulta interesante también evaluar su efectividad para la extracción de plaguicidas de muestras de suelo de diferente composición. Es importante recordar que incluso las variantes del método que recogen la utilización de un tampón de citratos o de acético/acetato han sido consideradas como métodos normalizados. Es el caso de la Norma EN 15662 (Comité Europeo de Estandarización, CEN) para el método del tampón de citratos y del Método Oficial AOAC 2007.01 (Asociación Oficial de Químicos Analíticos) para el que utiliza el tampón de acetato (LEHOTAY, 2007). Todo ello hace cada vez más evidente la importancia que está adquiriendo el método. Por lo tanto, el objetivo del trabajo desarrollado en la presente sección fue estudiar en profundidad la aplicación de una modificación del método QuEChERS para el análisis de once plaguicidas en suelos, considerando la posible existencia de efecto matriz en la determinación de los analitos de interés. Al igual que en la sección IV.2 de la presente Tesis Doctoral, este grupo de plaguicidas se seleccionó por su elevada utilización a nivel mundial. Todos ellos, a excepción del clorpirifos y del metil clorpirifos que sí habían sido estudiados (LESUEUR Y COLS., 2008), no habían sido previamente extraídos de suelos utilizando esta metodología.

IV.4.2.- SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA MEDIANTE GC-NPD

Al igual que en la sección IV.2, todos los plaguicidas seleccionados contenían átomos de nitrógeno y/o fósforo en su estructura (ver Tabla IV.4.1), por lo que se utilizó de nuevo el detector NPD para el análisis mediante GC. Una vez más, se utilizó el TPP como IS, añadiéndolo antes de realizar la extracción, excepto en los calibrados en la matriz, en los que se añadió al final junto con los analitos.

Tabla IV.4.1.- Estructura y propiedades de los plaguicidas utilizados para este estudio.

| Plaguicida (Familia) | Estructura | Actividad | Mw (g/mol) | pK _a | Solubilidad en agua (mg/L, 20 °C) | DT ₅₀ típico (días) | Log K _{ow} | K _{oc} (mL/g) |
|----------------------------|--|----------------------------|---------------|-----------------|--------------------------------------|-----------------------------------|------------------------|---------------------------|
| Etoprofos (OPP) |  | Insecticida, nematicida | 242,3 | - | 700 | 17 | 2,99 | 110 |
| Dimetoato (OPP) |  | Insecticida, acaricida | 229,3 | - | 39 800 | 2,6 | 0,704 | 30 |
| Diazinón (OPP) |  | Insecticida, acaricida | 304,4 | 2,6 | 60 | 9,1 | 3,69 | 643 |
| Malaoxon (OPP) |  | - | 314,3 | - | - | - | - | - |
| Metil-clorpirifos (OPP) |  | Insecticida, acaricida | 350,9 | - | 2,74 | 2,5 | 4,00 | 4645 |
| Fenitrotión (OPP) |  | Insecticida | 277,2 | - | 19 | 2,7 | 3,32 | 322 |

| | | | | | | | | |
|-------------------------------|--|---------------------------|-------|---|------|-------|------|------|
| Malatión (OPP) |  | Insecticida, acaricida | 330,4 | - | 145 | 0,17 | 2,75 | 217 |
| Clorpirifos (OPP) |  | Insecticida | 350,9 | - | 1,05 | 76 | 4,7 | 8151 |
| Fenamifos (OPP) |  | Nematicida | 303,4 | - | 345 | 0,85 | 3,3 | 754 |
| Buprofezín (tiadiazina) |  | Insecticida, acaricida | 305,4 | - | 0,46 | 135,4 | 4,93 | 2722 |
| Fosmet (OPP) |  | Insecticida, acaricida | 317,3 | - | 15,2 | 3,1 | 2,96 | 3212 |
| Trifenilfosfato (IS) (OPP) |  | - | 326,3 | - | - | - | - | - |

- Datos no encontrados/No aplicable. Mw: masa molecular. pK_a: constante de disociación ácida. DT₅₀: tiempo de semidesintegración o vida media. K_{ow}: coeficiente de partición octanol/agua. K_{oc}: coeficiente de adsorción de carbono orgánico del suelo (FOOTPRINT, IUPAC).

Dependiendo del procedimiento, la adición de un IS mejora el análisis cuantitativo ya que lo que se determina realmente es la relación de áreas $A_{\text{analito}}/A_{\text{IS}}$ que se mantiene constante durante todo el proceso. De esta forma, se compensan posibles pérdidas de los plaguicidas durante las diferentes etapas del proceso analítico y se corrige la variabilidad en la respuesta del detector debida a la matriz, diferencias entre inyecciones, etc. En el método QuEChERS el TPP ha sido frecuentemente utilizado con este fin (CUNHA Y COLS., 2007; KIRCHNER Y COLS., 2008; WALORCZYK, 2008).

La Figura IV.4.1 muestra el cromatograma correspondiente a la separación de los plaguicidas seleccionados en las condiciones óptimas (sección III.6.3). Ninguna modificación del gradiente de temperatura mejoró la separación de los picos, llegando a producir en todos los casos solapamiento de algunos de ellos. Al igual que en la sección IV.2, se obtuvieron picos con colas relativamente pequeñas y propias del uso de este tipo de columna y sistema de detección.

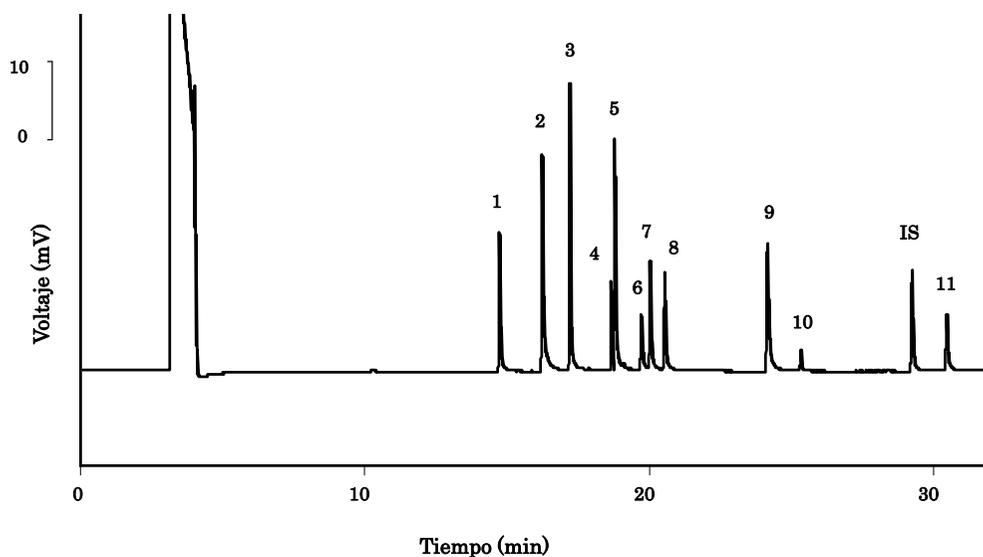


Figura IV.4.1.- Cromatograma GC-NPD de la separación de los plaguicidas seleccionados. Concentración: 0,65 mg/L de todos los plaguicidas y del IS. Flujo de nitrógeno como gas portador y de *make up*: 1,0 y 30 mL/min, respectivamente. Inyección de 2 μ L de muestra en modo *split/splitless* a 280 °C. El NPD se mantuvo a 280 °C con un flujo de nitrógeno de 4 mL/min. (1) Etoprofos, (2) dimetoato, (3) diazinón, (4) malaoxón, (5) metil-clorpirifos, (6) fenitrotión, (7) malatión, (8) clorpirifos, (9) fenamifos, (10) buprofezín, (IS) TPP y (11) fosmet.

IV.4.3.- MUESTRAS DE SUELO SELECCIONADAS

Para el presente estudio también se seleccionaron tres tipos de suelo: forestal, ornamental y agrícola. Todos ellos son suelos volcánicos de la isla de Tenerife que de nuevo se eligieron como representativos por sus diferentes usos y aplicaciones. La Tabla IV.4.2 muestra algunas de sus propiedades disponibles. El primero de ellos coincide con el utilizado en la sección IV.2. En todos los casos, los análisis correspondientes al pH en agua, pH en KCl, porcentaje de materia orgánica y conductividad eléctrica se llevaron a cabo siguiendo los procedimientos descritos en la sección III.6.1.

Tabla IV.4.2.- Algunas propiedades de los suelos seleccionados.

| Parámetro | Suelo | | |
|---|----------|------------|----------|
| | Forestal | Ornamental | Agrícola |
| Tipo | | | |
| pH (en agua) | 5,99 | 5,25 | 4,20 |
| pH (en KCl 0,1 N) | 4,78 | 4,99 | 3,92 |
| Materia orgánica (%) | - | - | 6,71 |
| Conductividad eléctrica a 25 °C (μS/cm) | 350 | 643 | 406 |

A raíz del análisis de los diferentes parámetros descritos con anterioridad, se puede deducir que el suelo ornamental seleccionado era fuertemente ácido con un exceso de minerales como Co, Cu, Fe, Mn y Zn y cantidades bajas de Ca, K, N, Mg, Mo, P y S. Por último, el suelo agrícola era extremadamente ácido, lo que indica elevadas cantidades de Al y Mn que pueden resultar tóxicas para algunos tipos de plantas. En general, los tres suelos tenían una baja salinidad.

IV.4.4.- APLICACIÓN DEL MÉTODO QuEChERS

Tal como se indicó en la sección I.3.2.1, la versión original del método QuEChERS incluye la extracción de 10 g de muestra con 10 mL de ACN, la adición de 4 g de MgSO₄ y 1 g de NaCl. Normalmente, en esta etapa, y dependiendo de los plaguicidas seleccionados, conviene adicionar un tampón como el de citratos (1 g citrato trisódico dihidratado y 0,5 g hidrogenocitrato disódico sesquihidratado) para mantener el pH controlado entre 5,0 y 5,5. Posteriormente y tras centrifugar, se toman 5 mL del sobrenadante y se someten

a la etapa de dSPE con 125 mg de PSA y 750 mg de MgSO₄.

Cuando se aplicó el procedimiento anteriormente descrito a la extracción de 10 g de suelo, se observó la ausencia de sobrenadante en la primera etapa. Con el objetivo de no aumentar los LODs del método, se incrementó el volumen de ACN añadido. El empleo de volúmenes más elevados de ACN requiere, por lo tanto, el uso de cantidades más elevadas, y en la proporción adecuada, de PSA y MgSO₄ en la etapa de dSPE. Se observó que el uso de 20 mL de ACN daba lugar a aproximadamente 10 mL de sobrenadante, por lo que se emplearon 250 mg de PSA y 1,5 g de MgSO₄ monohidratado, obteniendo porcentajes de recuperación altos para los plaguicidas estudiados en los tres suelos seleccionados (entre 45 y 96%), excepto para malatión y su metabolito malaoxón, que no pudieron ser extraídos cuantitativamente de los suelos forestal y ornamental, debido posiblemente, a las propiedades inherentes de cada suelo. Cuando se utilizaron cantidades menores, se produjeron pérdidas importantes, en torno a un 20%, de clorpirifos, metil-clorpirifos, fenamifos, malatión y malaoxón, lo cual se justifica por una limpieza insuficiente de la muestra.

Por otra parte, en la bibliografía se ha descrito que, en los casos en los que el contenido acuoso de la matriz sea bajo, la adición de ACN junto con una cantidad de agua tal que el contenido total de la misma sea igual a la cantidad de muestra, puede ser favorecedora (WALORCZYK, 2007). Con ello se consiguen debilitar las posibles interacciones entre los analitos y la matriz, favoreciendo la extracción. Hay que tener en cuenta que la adición de agua estaba recomendada para matrices alimentarias como los cereales, harinas, etc. En este sentido, y dado que esta modificación también se había propuesto en algunas de las aplicaciones del método QuEChERS al análisis de suelos (DONG Y COLS., 2009; DROŹDŹYŃSKI Y KOWALSKA, 2009; CHEN Y COLS., 2009), se realizaron experiencias añadiendo la cantidad de agua apropiada en la etapa inicial, obteniendo resultados prácticamente similares a los obtenidos sin su adición para los tres suelos, por lo que finalmente se prescindió de ella. En lo que respecta a los cromatogramas obtenidos, tampoco se observaron diferencias.

IV.4.5.- VALIDACIÓN DEL MÉTODO

Una vez optimizado el procedimiento QuEChERS-GC-NPD, se procedió a

la validación de la metodología, llevando a cabo estudios de calibración, de recuperaciones y de precisión y exactitud.

IV.4.5.1.- CALIBRADO EN LA MATRIZ

Teniendo en cuenta que la mayoría de los analitos de estudio se encuentran entre los compuestos que se ven típicamente afectados por el efecto matriz (SCHMECK Y WENCLAWIAK, 2005), también en este caso se llevó a cabo la comprobación de la existencia del mismo. La Tabla IV.4.3 muestra los datos de calibración de los estándares disueltos en ciclohexano puro y en el extracto de cada tipo de suelo ($n = 6$ en todos los casos). La respuesta del detector fue lineal para cada plaguicida en el rango estudiado, con coeficientes de determinación (R^2) superiores a 0,998. En ninguno de los tres suelos se encontraron residuos de los plaguicidas seleccionados. Sin embargo, se observaron algunas interferencias provenientes de la matriz, que en ningún caso supusieron un problema en la determinación de los analitos de interés. La Figura IV.4.2 muestra, como ejemplo, el cromatograma de una muestra de suelo forestal enriquecida, y el análisis de una muestra sin enriquecer de cada tipo de suelo.

Para comprobar la existencia de efecto matriz, se llevó a cabo una comparación estadística entre el calibrado en ciclohexano y en cada extracto de suelo mediante un test de *Fisher*. Para los tres tipos de suelo, todos los plaguicidas mostraron un importante efecto matriz con respecto al calibrado en ciclohexano, excepto el buprofezín, para el que los calibrados en ciclohexano y en el suelo ornamental eran comparables. Por otra parte, cuando se comparó entre calibrados realizados en los extractos de diferentes suelos, no se observaron diferencias significativas para el fenamifos en los tres tipos de suelo, mientras que entre los suelos forestal y agrícola existieron diferencias para todos los plaguicidas, excepto para etoprofos, malaoxón, metil-clorpirifos y malatión. Para el resto de los casos, existió efecto matriz. Por tanto, y a la vista de la heterogeneidad de los resultados obtenidos, se hizo necesaria la cuantificación utilizando los calibrados en la matriz.

Los LODs instrumentales obtenidos oscilaron entre 2,52 y 27,9 $\mu\text{g/L}$ para los estándares disueltos en ciclohexano puro, mientras que para los analitos disueltos en los extractos de cada suelo, se obtuvieron valores similares, entre

4,87 y 58,5 $\mu\text{g/L}$ para el suelo forestal, entre 5,58 y 67,2 $\mu\text{g/L}$ para el suelo ornamental y entre 4,16 y 42,3 $\mu\text{g/L}$ para el suelo agrícola.

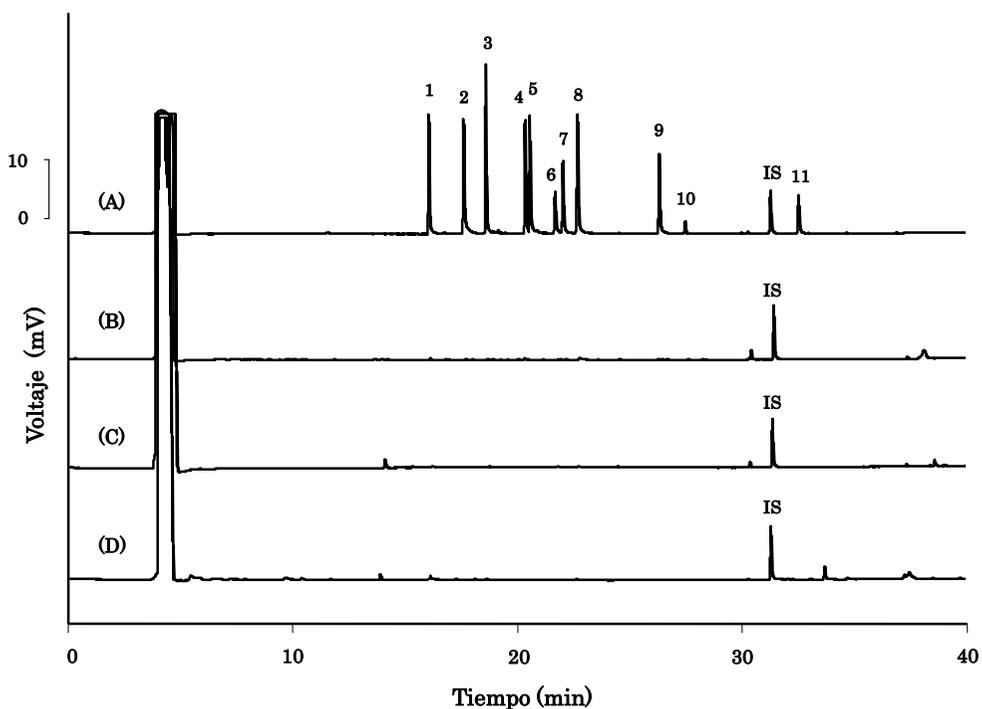


Figura IV.4.2.- Cromatograma obtenido tras el procedimiento QuEChERS-GC-NPD de (A) una muestra enriquecida de suelo forestal (concentración: aprox. 100 ng/g de cada plaguicida); (B), (C) y (D) una muestra sin enriquecer de los suelos forestal, ornamental y agrícola, respectivamente. Resto de las condiciones análogas a las de la Figura IV.4.1. (1) Etoprofos, (2) dimetoato, (3) diazinón, (4) malaoxón, (5) metil-clorpirifos, (6) fenitrotión, (7) malatión, (8) clorpirifos, (9) fenamifos, (10) buprofezín, (IS) TPP y (11) fosmet.

IV.4.5.2.- ESTUDIO DE RECUPERACIONES

La repetibilidad de la metodología QuEChERS-GC-NPD desarrollada fue evaluada mediante la realización de un estudio de recuperaciones a dos niveles de concentración para los tres suelos. Las muestras de suelo (10 g) se enriquecieron añadiendo el volumen adecuado de los estándares disueltos en ciclohexano y de IS. Todas las experiencias se llevaron a cabo por quintuplicado ($n = 5$) a cada nivel. Los resultados de este estudio, al igual que los niveles de concentración y los LODs, se muestran en la Tabla IV.4.4.

Tabla IV.4.3.- Datos de calibración del grupo de plaguicidas seleccionado (estándares preparados en ciclohexano y en el extracto final de cada suelo tras aplicar la metodología QuEChERS-GC-NPD) y comprobación del efecto matriz.

| Plaguicida | Suelo | Rango lineal (mg/L) | $b \pm t S_b$ | $a \pm t S_a$ | R^2 | LOD ^{a)} (µg/L) | Efecto matriz ^{b)} | Efecto matriz ^{c)} | Efecto matriz ^{d)} |
|------------|------------------|---------------------|---------------|----------------|-------|--------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Etoprofos | Ciclohexano puro | 0,024-1,69 | 2,70 ± 0,05 | -0,022 ± 0,039 | 0,999 | 2,52 | - | - | - |
| | Forestal | 0,085-1,69 | 2,38 ± 0,20 | 0,085 ± 0,167 | 0,998 | 4,87 | Sí | Sí | No |
| | Ornamental | 0,085-1,69 | 2,92 ± 0,09 | -0,030 ± 0,075 | 0,999 | 5,58 | Sí | - | Sí |
| | Agrícola | 0,085-1,69 | 2,45 ± 0,06 | 0,025 ± 0,053 | 0,999 | 4,16 | Sí | - | - |
| Dimetoato | Ciclohexano puro | 0,046-3,20 | 1,02 ± 0,03 | -0,075 ± 0,044 | 0,999 | 9,23 | - | - | - |
| | Forestal | 0,160-3,20 | 1,46 ± 0,09 | -0,067 ± 0,138 | 0,999 | 16,1 | Sí | Sí | Sí |
| | Ornamental | 0,160-3,20 | 1,53 ± 0,04 | -0,072 ± 0,064 | 0,999 | 11,9 | Sí | - | Sí |
| | Agrícola | 0,160-3,20 | 1,01 ± 0,06 | -0,004 ± 0,100 | 0,999 | 12,6 | Sí | - | - |
| Diazinón | Ciclohexano puro | 0,036-2,50 | 2,26 ± 0,04 | -0,010 ± 0,041 | 0,999 | 2,59 | - | - | - |
| | Forestal | 0,125-2,49 | 2,02 ± 0,16 | 0,121 ± 0,195 | 0,998 | 5,01 | Sí | Sí | Sí |
| | Ornamental | 0,125-2,49 | 2,44 ± 0,05 | -0,009 ± 0,060 | 0,999 | 5,59 | Sí | - | Sí |
| | Agrícola | 0,125-2,49 | 2,16 ± 0,04 | 0,021 ± 0,053 | 0,998 | 4,59 | Sí | - | - |
| Malaoxón | Ciclohexano puro | 0,048-3,37 | 1,08 ± 0,05 | -0,076 ± 0,068 | 0,999 | 7,13 | - | - | - |
| | Forestal | 0,169-3,37 | 1,16 ± 0,08 | 0,004 ± 0,138 | 0,999 | 11,1 | Sí | Sí | No |
| | Ornamental | 0,169-3,37 | 1,30 ± 0,04 | 0,010 ± 0,061 | 0,999 | 11,3 | Sí | - | Sí |
| | Agrícola | 0,169-3,37 | 1,12 ± 0,14 | 0,010 ± 0,248 | 0,998 | 9,84 | Sí | - | - |

(Continúa en página siguiente)

Tabla IV.4.3.- (Continuación)

| Plaguicida | Suelo | Rango lineal (mg/L) | $b \pm t S_b$ | $a \pm t S_a$ | R^2 | LOD ^{a)} (µg/L) | Efecto matriz ^{b)} | Efecto matriz ^{c)} | Efecto matriz ^{d)} |
|-------------------|------------------|---------------------|-----------------|--------------------|-------|--------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Metil-clorpirifos | Ciclohexano puro | 0,038-2,66 | $1,97 \pm 0,02$ | $-0,033 \pm 0,021$ | 0,999 | 4,17 | - | - | - |
| | Forestal | 0,133-2,66 | $1,86 \pm 0,15$ | $-0,004 \pm 0,202$ | 0,998 | 7,81 | Sí | Sí | No |
| | Ornamental | 0,133-2,66 | $2,25 \pm 0,06$ | $-0,077 \pm 0,072$ | 0,999 | 8,64 | Sí | - | Sí |
| | Agrícola | 0,133-2,66 | $1,86 \pm 0,07$ | $0,027 \pm 0,088$ | 0,999 | 6,81 | Sí | - | - |
| Fenitrotión | Ciclohexano puro | 0,036-1,00 | $1,67 \pm 0,03$ | $-0,030 \pm 0,012$ | 0,999 | 5,92 | - | - | - |
| | Forestal | 0,501-1,00 | $1,93 \pm 0,14$ | $-0,015 \pm 0,067$ | 0,999 | 8,45 | Sí | Sí | Sí |
| | Ornamental | 0,501-1,00 | $2,20 \pm 0,25$ | $-0,041 \pm 0,137$ | 0,998 | 8,18 | Sí | - | Sí |
| | Agrícola | 0,501-1,00 | $1,71 \pm 0,05$ | $0,012 \pm 0,027$ | 0,999 | 7,63 | Sí | - | - |
| Malatión | Ciclohexano puro | 0,025-1,77 | $1,90 \pm 0,03$ | $-0,029 \pm 0,020$ | 0,999 | 4,50 | - | - | - |
| | Forestal | 0,089-1,77 | $1,76 \pm 0,16$ | $-0,007 \pm 0,17$ | 0,998 | 8,49 | Sí | Sí | No |
| | Ornamental | 0,089-1,77 | $1,98 \pm 0,05$ | $-0,018 \pm 0,045$ | 0,999 | 9,41 | Sí | - | Sí |
| | Agrícola | 0,089-1,77 | $1,79 \pm 0,10$ | $0,028 \pm 0,089$ | 0,999 | 7,26 | Sí | - | - |
| Clorpirifos | Ciclohexano puro | 0,036-2,50 | $2,21 \pm 0,05$ | $-0,034 \pm 0,054$ | 0,999 | 3,78 | - | - | - |
| | Forestal | 0,125-2,50 | $1,97 \pm 0,19$ | $0,083 \pm 0,236$ | 0,998 | 7,21 | Sí | Sí | Sí |
| | Ornamental | 0,125-2,50 | $2,27 \pm 0,06$ | $-0,034 \pm 0,075$ | 0,999 | 8,17 | Sí | - | Sí |
| | Agrícola | 0,125-2,50 | $2,12 \pm 0,12$ | $0,029 \pm 0,148$ | 0,999 | 6,15 | Sí | - | - |

| | | | | | | | | | |
|------------|------------------|------------|---------------|----------------|-------|------|----|----|----|
| Fenamifos | Ciclohexano puro | 0,068-1,91 | 1,62 ± 0,08 | -0,085 ± 0,069 | 0,999 | 5,45 | - | - | - |
| | Forestal | 0,095-1,91 | 1,82 ± 0,14 | -0,039 ± 0,133 | 0,998 | 10,4 | Sí | No | No |
| | Ornamental | 0,095-1,91 | 1,78 ± 0,03 | -0,029 ± 0,032 | 0,999 | 10,5 | Sí | - | No |
| | Agrícola | 0,095-1,91 | 1,80 ± 0,05 | -0,050 ± 0,048 | 0,999 | 6,99 | Sí | - | - |
| Buprofezín | Ciclohexano puro | 0,104-2,08 | 0,228 ± 0,005 | -0,006 ± 0,005 | 0,999 | 27,9 | - | - | - |
| | Forestal | 0,104-2,08 | 0,204 ± 0,011 | -0,000 ± 0,011 | 0,999 | 58,5 | Sí | Sí | Sí |
| | Ornamental | 0,104-2,08 | 0,226 ± 0,007 | -0,004 ± 0,007 | 0,999 | 67,2 | No | - | Sí |
| | Agrícola | 0,104-2,08 | 0,211 ± 0,007 | 0,005 ± 0,007 | 0,999 | 42,3 | Sí | - | - |
| Fosmet | Ciclohexano puro | 0,065-1,81 | 0,717 ± 0,024 | -0,031 ± 0,020 | 0,999 | 14,7 | - | - | - |
| | Forestal | 0,091-1,81 | 1,05 ± 0,09 | -0,046 ± 0,078 | 0,998 | 18,8 | Sí | Sí | Sí |
| | Ornamental | 0,091-1,81 | 0,904 ± 0,01 | -0,009 ± 0,009 | 0,999 | 20,5 | Sí | - | Sí |
| | Agrícola | 0,091-1,81 | 0,927 ± 0,03 | -0,019 ± 0,022 | 0,999 | 13,0 | Sí | - | - |

- No aplicable. a) Calculado como la concentración capaz de proporcionar una relación S/N de 3. b) Efecto matriz con respecto a los estándares disueltos en ciclohexano puro. c) Efecto matriz con respecto a los estándares disueltos en la matriz del suelo ornamental. d) Efecto matriz con respecto a los estándares disueltos en la matriz del suelo agrícola. 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^2 : coeficiente de determinación ($n = 6$).

Para calcular los porcentajes de recuperación, se realizó una comparación de la relación A/A_{IS} con la obtenida para el estándar en la matriz. Se obtuvieron valores entre el 60 y el 96% para el suelo forestal (excepto para malatión y malaoxón, que no pudieron ser extraídos), entre el 45 y el 87% para el suelo ornamental (excepto, de nuevo, para malatión y malaoxón, que se extrajeron en un porcentaje entre el 9 y el 29%) y entre el 64 y el 96% para el suelo agrícola. Se obtuvieron RSD menores del 15% para todos los casos.

En general, los porcentajes de recuperación son altamente dependientes del tipo de suelo analizado (LESUEUR Y COLS., 2008). Como se puede observar, las recuperaciones en el suelo ornamental fueron, en general, más bajas que para los otros dos tipos de suelo, un hecho que se verificó también en el trabajo desarrollado en la sección IV.2 de la presente Tesis Doctoral. Esto posiblemente se debe a la cantidad de materia orgánica relativamente alta que contenía este suelo con respecto a los otros dos. El suelo ornamental era en realidad una mezcla de un suelo fértil y una gran cantidad de turba (acumulación de materia vegetal parcialmente descompuesta) y, como resultado, contenía una elevada cantidad de componentes orgánicos como ácidos fúlvicos y húmicos, que pueden afectar a la eficacia de la extracción. Además, para la mayoría de los plaguicidas, el contenido de materia orgánica es la propiedad del suelo más importante que afecta al grado de adsorción en él, de manera que cuanto mayor es la cantidad de materia orgánica, mayor es la adsorción en el mismo (ANDREU Y PICÓ, 2004).

En este punto, cabe destacar el comportamiento observado para el malatión y el malaoxón en los suelos forestal y ornamental. En el primero de ellos, se observaron bajos porcentajes de recuperación (entre el 9 y el 29%), mientras que en el suelo forestal, los resultados fueron inconsistentes debido a que se obtuvieron porcentajes de recuperación variables para los dos niveles de concentración estudiados. De los plaguicidas seleccionados, el malatión tiene una vida media en el suelo corta (una media de 4 h). Dado que la degradación de los plaguicidas en el suelo depende de forma importante de las características de éste, puede ser posible que, en el caso que nos ocupa, la degradación del malatión en el suelo forestal ocurriera de una manera irreplicable a la vez que extremadamente rápida.

Tabla IV.4.4.- Valores de recuperación relativa promedio (% R), de RSD, concentración añadida de plaguicida y LODs de la metodología QuEChERS-GC-NPD para cada tipo de suelo.

| Plaguicida | Suelo forestal | | | Suelo ornamental | | | Suelo agrícola | | |
|-------------------|--|--|---------------|--|--|---------------|--|--|---------------|
| | Nivel 1 % R ^a (RSD, %) (Conc., ng/g) | Nivel 2 % R ^a (RSD, %) (Conc., ng/g) | LOD (ng/g) | Nivel 1 % R ^a (RSD, %) (Conc., ng/g) | Nivel 2 % R ^a (RSD, %) (Conc., ng/g) | LOD (ng/g) | Nivel 1 % R ^a (RSD, %) (Conc., ng/g) | Nivel 2 % R ^a (RSD, %) (Conc., ng/g) | LOD (ng/g) |
| Etoprofos | 85 (9) (24,2) | 94 (9) (60,5) | 0,545 | 80 (2) (24,2) | 84 (2) (60,5) | 0,682 | 88 (4) (24,2) | 84 (3) (60,5) | 0,484 |
| Dimetoato | 72 (12) (37,8) | 94 (7) (94,4) | 2,14 | 86 (7) (37,8) | 73 (10) (94,4) | 1,51 | 62 (9) (37,8) | 70 (2) (94,4) | 1,91 |
| Diazinón | 91 (9) (37,6) | 96 (10) (94,1) | 0,537 | 77 (1) (37,6) | 80 (2) (94,1) | 0,712 | 77 (3) (37,6) | 83 (4) (94,1) | 0,574 |
| Malaoxón | - | - | - | 9 (11) (38,5) | 9 (6) (96,3) | 12,5 | 79 (4) (38,5) | 76 (7) (96,3) | 1,27 |
| Metil-clorpirifos | 69 (8) (30,0) | 60 (10) (74,9) | 1,24 | 64 (2) (30,0) | 66 (3) (74,9) | 1,34 | 63 (4) (30,0) | 77 (3) (74,9) | 0,986 |
| Fenitrotión | 82 (7) (15,3) | 72 (7) (38,2) | 1,10 | 45 (15) (15,3) | 60 (5) (38,2) | 1,58 | 63 (4) (15,3) | 79 (5) (38,2) | 1,13 |
| Malatión | - | - | - | 26 (5) (25,3) | 29 (3) (63,2) | 3,45 | 75 (4) (25,3) | 87 (8) (63,2) | 0,905 |
| Clorpirifos | 86 (7) (25,8) | 89 (9) (64,5) | 0,823 | 79 (4) (25,8) | 84 (1) (64,5) | 1,01 | 83 (5) (25,8) | 84 (3) (64,5) | 0,737 |
| Fenamifos | 62 (8) (23,4) | 67 (7) (58,4) | 1,61 | 52 (12) (23,4) | 58 (7) (58,4) | 1,92 | 79 (5) (23,4) | 78 (4) (58,4) | 0,889 |
| Buprofezín | 96 (5) (29,8) | 84 (10) (74,4) | 6,54 | 87 (2) (29,8) | 86 (2) (74,4) | 7,78 | 68 (9) (29,8) | 82 (6) (74,4) | 5,71 |
| Fosmet | 70 (10) (25,9) | 60 (2) (64,7) | 2,92 | 82 (2) (25,9) | 70 (4) (64,7) | 2,72 | 84 (2) (25,9) | 96 (10) (64,7) | 1,45 |

- Plaguicidas no extraídos. a) Media de cinco extracciones ($n = 5$), 1,5 g de suelo.

Por último, cabe enfatizar que se obtuvieron LODs del método entre 0,545 y 6,54 ng/g para el suelo forestal (excluyendo malaoxón y malatión), entre 0,682 y 12,5 ng/g para el suelo ornamental y entre 0,484 y 5,71 ng/g para el suelo agrícola, mientras que los LOQs obtenidos se encontraron entre 1,79 y 21,8 ng/g, 2,27 y 41,6 ng/g y 1,61 y 19,0 ng/g, respectivamente. Estos LODs y LOQs son del mismo orden de magnitud o incluso menores, que los obtenidos para plaguicidas similares en trabajos previamente publicados (ANDREU Y PICO, 2004; DÍAZ-CRUZ Y BARCELÓ, 2006; FUENTES Y COLS., 2007; LESUEUR Y COLS., 2008).

En lo que respecta a los trabajos que utilizaban este método para la determinación de plaguicidas en suelos (LESUEUR Y COLS., 2008; CHEN Y COLS., 2009; DROŹDŹYŃSKI Y KOWALSKA, 2009; DONG Y COLS., 2009), tal como se indicó en los antecedentes, se obtuvieron LODs entre 1 y 88 ng/g, valores también similares o incluso más elevados que los obtenidos en el presente estudio. Además, del grupo de plaguicidas seleccionado, sólo clorpirifos y metil-clorpirifos habían sido estudiados en una ocasión (LESUEUR Y COLS., 2008). En dicho caso, se obtuvieron porcentajes de recuperación también relativamente bajos (<35% en algunos suelos) y LODs, utilizando GC-MS como técnica de determinación, de 24 y 37 ng/g, respectivamente, valores más elevados que los obtenidos en este caso (0,737-1,24 ng/g).

IV.4.5.3.- ESTUDIO DE PRECISIÓN Y EXACTITUD

Para demostrar la aplicabilidad del método desarrollado, cada muestra de suelo se enriqueció con los plaguicidas a dos niveles de concentración diferentes y se analizaron al día siguiente mediante el método propuesto por quintuplicado ($m = 5$). La concentración encontrada para cada plaguicida fue comparada con la concentración añadida utilizando el test t de *Student*. Los resultados se muestran en la Tabla IV.4.5.

Como se puede observar, todos los valores de t obtenidos fueron menores que el tabulado (2,78 para $m - 1 = 4$, $\alpha = 0,05$). El grado de concordancia entre la concentración añadida y la encontrada se encontró entre el 93 y el 113%, lo que demuestra claramente la idoneidad del método propuesto. Los valores correspondientes a la extracción del malatión y malaoxón de los suelos forestal y ornamental no se calcularon debido a las bajas recuperaciones obtenidas.

Tabla IV.4.5.- Resultados del estudio de precisión y exactitud de la metodología QuEChERS-GC-NPD propuesta para cada plaguicida y tipo de suelo.

| Plaguicida | Suelo | Conc. añadida (ng/g) | Conc. encontrada (ng/g) ^{a)} | Exactitud (%) | <i>f</i> ^{b)} |
|------------|------------|----------------------|---------------------------------------|---------------|------------------------|
| Etoprofos | Forestal | 43,6 | 43,9 ± 9,8 | 101 | 1,62 |
| | Ornamental | | 42,1 ± 2,8 | 97 | 1,89 |
| | Agrícola | | 45,3 ± 2,2 | 104 | 2,47 |
| | Forestal | 77,5 | 79,4 ± 6,6 | 102 | 1,27 |
| | Ornamental | | 73,9 ± 2,6 | 95 | 1,59 |
| | Agrícola | | 84,5 ± 2,1 | 109 | 2,73 |
| Dimetoato | Forestal | 68,0 | 66,4 ± 15,1 | 98 | 0,54 |
| | Ornamental | | 62,9 ± 4,7 | 94 | 2,57 |
| | Agrícola | | 70,7 ± 12,8 | 104 | 0,95 |
| | Forestal | 121 | 113 ± 10 | 93 | 1,69 |
| | Ornamental | | 130 ± 4 | 107 | 0,88 |
| | Agrícola | | 130 ± 12 | 107 | 1,34 |
| Diazinón | Forestal | 67,7 | 68,3 ± 12,8 | 101 | 1,72 |
| | Ornamental | | 66,4 ± 2,7 | 98 | 0,50 |
| | Agrícola | | 70,3 ± 2,7 | 104 | 2,02 |
| | Forestal | 120 | 116 ± 9 | 96 | 1,53 |
| | Ornamental | | 114 ± 3 | 95 | 2,38 |
| | Agrícola | | 129 ± 3 | 107 | 2,33 |
| Malaoxón | Forestal | 69,3 | - | - | - |
| | Ornamental | | - | - | - |
| | Agrícola | | 65,3 ± 6,5 | 94 | 1,53 |
| | Forestal | 123 | - | - | - |
| | Ornamental | | - | - | - |
| | Agrícola | | 117 ± 7 | 95 | 2,71 |

(Continúa en la página siguiente)

Tabla IV.4.5.- (Continuación)

| Plaguicida | Suelo | Conc. añadida (ng/g) | Conc. encontrada (ng/g) ^{a)} | Exactitud (%) | $f^b)$ |
|-------------------|------------|----------------------|---------------------------------------|---------------|--------|
| Metil-clorpirifos | Forestal | | 53,9 ± 21,3 | 100 | 0,15 |
| | Ornamental | 53,9 | 57,8 ± 4,5 | 107 | 1,82 |
| | Agrícola | | 60,0 ± 6,2 | 111 | 0,99 |
| | Forestal | | 101 ± 15 | 105 | 2,49 |
| | Ornamental | 95,9 | 105 ± 4 | 110 | 2,50 |
| | Agrícola | | 105 ± 5 | 109 | 2,52 |
| Fenitrotión | Forestal | | 26,5 ± 5,7 | 97 | 2,48 |
| | Ornamental | 27,5 | 29,7 ± 8,6 | 108 | 2,47 |
| | Agrícola | | 29,7 ± 1,6 | 108 | 1,98 |
| | Forestal | | 47,1 ± 3,8 | 97 | 2,07 |
| | Ornamental | 48,8 | 51,1 ± 7,9 | 105 | 0,68 |
| | Agrícola | | 50,1 ± 1,6 | 103 | 1,76 |
| Malatión | Forestal | | - | - | - |
| | Ornamental | 45,5 | - | - | - |
| | Agrícola | | 48,2 ± 5,4 | 106 | 1,80 |
| | Forestal | | - | - | - |
| | Ornamental | 81,0 | - | - | - |
| | Agrícola | | 76,2 ± 5,2 | 94 | 1,27 |
| Clorpirifos | Forestal | | 47,1 ± 17,0 | 101 | 2,26 |
| | Ornamental | 46,4 | 50,1 ± 3,6 | 108 | 1,06 |
| | Agrícola | | 49,7 ± 7,5 | 107 | 0,74 |
| | Forestal | | 87,4 ± 11,2 | 106 | 1,26 |
| | Ornamental | 82,5 | 93,9 ± 3,4 | 114 | 1,94 |
| | Agrícola | | 88,4 ± 7,0 | 107 | 1,94 |

| | | | | | |
|------------|------------|------|-------------|-----|------|
| Fenamifos | Forestal | | 46,5 ± 13,8 | 111 | 2,70 |
| | Ornamental | 42,1 | 47,5 ± 3,2 | 113 | 1,51 |
| | Agrícola | | 45,7 ± 7,3 | 109 | 1,75 |
| | Forestal | | 77,9 ± 9,4 | 104 | 2,18 |
| | Ornamental | 74,8 | 76,6 ± 3,0 | 102 | 0,51 |
| | Agrícola | | 79,9 ± 7,0 | 107 | 1,31 |
| Buprofezín | Forestal | | 53,8 ± 8,1 | 100 | 0,26 |
| | Ornamental | 53,6 | 50,8 ± 3,5 | 95 | 0,82 |
| | Agrícola | | 51,3 ± 4,3 | 96 | 1,20 |
| | Forestal | | 90,3 ± 5,6 | 95 | 0,89 |
| | Ornamental | 95,2 | 101 ± 3 | 106 | 2,74 |
| | Agrícola | | 101 ± 4 | 106 | 2,53 |
| Fosmet | Forestal | | 49,3 ± 14,7 | 102 | 0,30 |
| | Ornamental | 48,4 | 54,9 ± 1,1 | 114 | 1,38 |
| | Agrícola | | 54,9 ± 2,2 | 113 | 1,48 |
| | Forestal | | 79,8 ± 9,7 | 93 | 2,64 |
| | Ornamental | 86,0 | 88,8 ± 1,1 | 103 | 0,39 |
| | Agrícola | | 78,8 ± 2,2 | 92 | 1,25 |

- No aplicable. a) Media ± intervalo de confianza de cinco extracciones ($m = 5$). b) $t_{tab} = 2,78$, $m \cdot 1 = 4$, $\alpha = 0,05$.

IV.4.6.- APLICACIÓN AL ANÁLISIS DE MUESTRAS REALES

Una vez demostrada la validez del método, éste se utilizó para estudiar la concentración/acumulación de clorpirifos en un suelo agrícola dedicado al cultivo de papas y que había sido previamente sometido a diversas aplicaciones de este plaguicida. Se trató de un estudio planteado conjuntamente con el Instituto Canario de Investigaciones Agrarias (ICIA) con sede en Valle de Guerra, La Laguna (Tenerife), a raíz de las actividades desarrolladas durante la presente Tesis Doctoral.

La parcela donde estaba plantado este cultivo estaba dividida en cuatro partes iguales perfectamente separadas: dos subparcelas dedicadas al cultivo de regadío y otras dos al cultivo de secano. Periódicamente, una porción representativa de suelo de cada una de las cuatro subparcelas fue recolectada y analizada por duplicado mediante el método QuEChERS-GC-NPD desarrollado, siendo confirmada la presencia de clorpirifos mediante QuEChERS-GC-MS. En este caso, la ionización se llevó a cabo por EI a 70 eV.

El primer tratamiento que recibió la parcela se realizó el 13 de marzo de 2009. Las muestras 1 y 2 se recolectaron el 30 de marzo y el 8 de mayo, respectivamente. Se aplicó un segundo tratamiento el 11 de mayo y catorce días después, se procedió a la recolección de la muestra 3. Finalmente, se aplicó un último tratamiento el 1 de junio y se recolectó la muestra 4 ocho días más tarde. Todas las muestras fueron tomadas entre 0 y 10 cm de profundidad.

La Figura IV.4.4 muestra el cromatograma GC-NPD de una de las muestras de suelo recolectadas que contenía clorpirifos y que fue sometida al método previamente desarrollado, empleando una columna Equity-5 de 30 m. La Figura IV.4.5, por su parte, muestra el cromatograma GC-MS de la misma, así como el espectro de MS en modo *full-scan*, utilizando en este caso una columna DB-5MS de 30 m y el mismo programa de temperatura que en el caso anterior. En el espectro de masas obtenido en el modo *full-scan* para todas las muestras positivas se pudieron apreciar los iones de relación m/z 314 [$M^+ \cdot HCl$], 286, 258, 199 y 198, que se corresponden con los descritos anteriormente por ionización por EI a 70 eV para un estándar de clorpirifos (SINHA Y COLS., 2006). La presencia de este plaguicida fue, no obstante, confirmada mediante la librería NIST (NIST,

2009), que contiene más de ciento cincuenta mil espectros de masas de estándares de compuestos orgánicos.

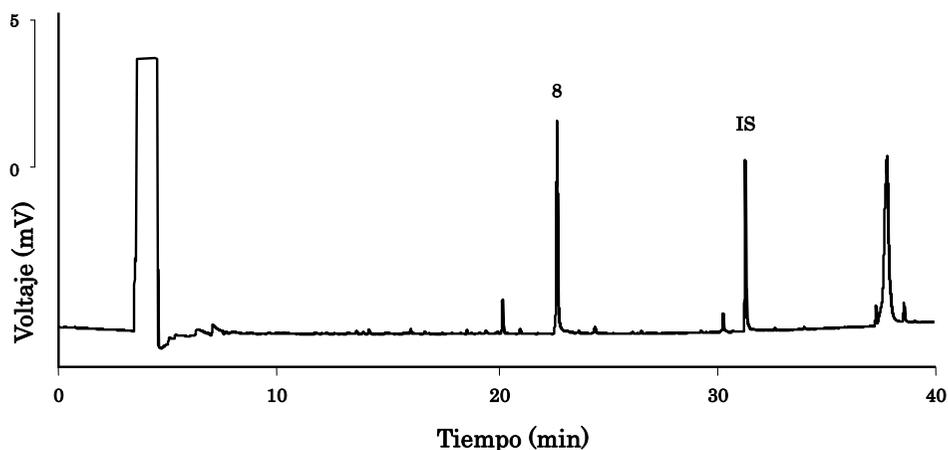


Figura IV.4.4.- Cromatograma GC-NPD correspondiente al análisis de una muestra de suelo agrícola dedicada al cultivo de papas tratado con clorpirifos. Resto de las condiciones análogas a las de la Figura IV.4.1. (8) Clorpirifos y (IS) TPP.

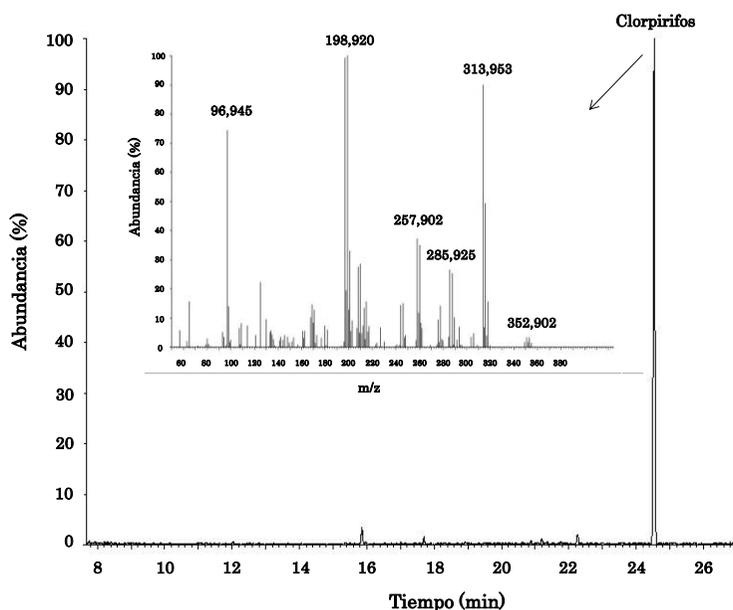


Figura IV.4.5.- Cromatograma GC-MS correspondiente al análisis de una muestra de suelo agrícola dedicada al cultivo de la papa tratada mediante el método QuEChERS desarrollado, en la que aparece el pico correspondiente al clorpirifos, así como el espectro de masas en el modo *full-scan* del clorpirifos con los iones de relación m/z 314, 286, 258, 199 y 197 característicos de su fragmentación por EI. La fuente de iones se mantuvo a 230 °C y la ionización tuvo lugar a 70 eV.

La Figura IV.4.6 muestra los resultados de los análisis de las muestras recogidas considerando el valor promedio del análisis de dos muestras de la zona de regadío y dos muestras de la zona de secano, con sus correspondientes barras de error que representan la incertidumbre en la determinación.

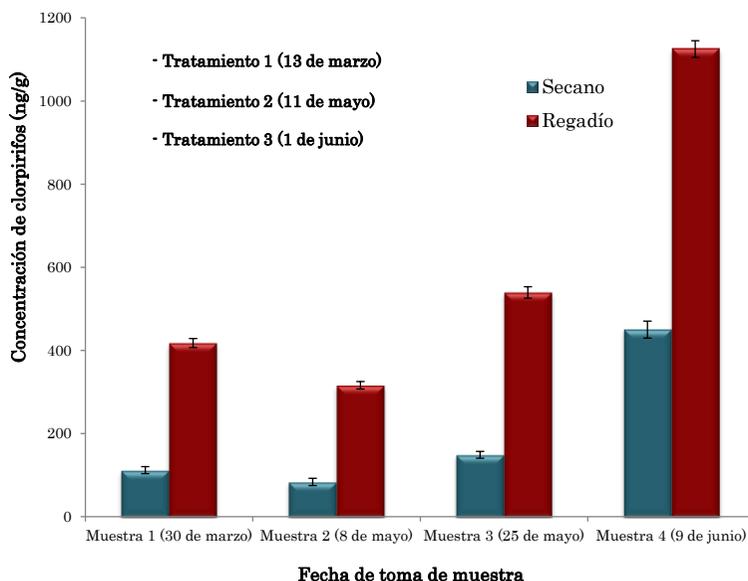


Figura IV.4.6.- Diagrama de barras que muestra los resultados de los análisis de los suelos tratados con clorpirifos, para cultivo de secano y de regadío. Las barras de error representan la incertidumbre en la determinación de la concentración ($n = 2$).

De este estudio se pudieron extraer diversas conclusiones. En primer lugar, es importante puntualizar que, en todos los casos, la concentración de clorpirifos en el suelo de secano fue menor que en el suelo de regadío, probablemente debido a dos factores: uno de ellos es que el riego del terreno produce un movimiento del plaguicida hacia zonas más profundas y permanece más protegido frente a factores externos (luz UV, calor y factores medioambientales en general) que evitan su degradación; el otro es el efecto de lavado de las hojas de las plantas cuando se produce el riego, desplazando el plaguicida de las mismas hacia el suelo. Por otra parte, la concentración de la muestra 2 es menor que la de la muestra 1, debido a la degradación del compuesto a lo largo del tiempo (el tiempo transcurrido entre la toma de una muestra y otra fue algo superior a un mes). Una vez aplicado el segundo tratamiento, la concentración de clorpirifos aumentó de nuevo en la muestra 3,

análogamente a lo que ocurre tras el tercer tratamiento. Este hecho demuestra claramente la acumulación del plaguicida en el suelo producida como consecuencia de realizar aplicaciones consecutivas sobre el mismo.

IV.4.7.- CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en esta sección, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- Se desarrolló una modificación del método QuEChERS para el análisis de once plaguicidas, en su mayoría OPPs (etoprofos, dimetoato, diazinón, malaoxón, metil-clorpirifos, fenitrotión, malatión, clorpirifos, fenamifos y fosmet) y una tiadiazina (buprofezín) en muestras de suelo (forestal, ornamental y agrícola) con determinación mediante GC-NPD.
- La modificación del método QuEChERS consistió en la extracción de 10 g de suelo con 20 mL de ACN, 4 g de MgSO_4 monohidratado, 1 g de NaCl, 1 g citrato trisódico dihidratado y 0,5 g hidrogenocitrato disódico sesquihidratado, seguido de una etapa de limpieza mediante dSPE con 250 mg de PSA y 1,5 g MgSO_4 monohidratado. El método de extracción permitió alcanzar LODs adecuados consumiendo una baja cantidad de disolventes orgánicos por muestra, tan solo 20 mL de ACN y 1 mL de ciclohexano.
- La evaluación del efecto matriz para cada tipo de suelo demostró la necesidad de utilizar un calibrado específico para cada uno de ellos, obteniendo una buena linealidad en todos los casos ($R^2 \geq 0,998$). Además, se obtuvieron porcentajes de recuperación relativa aceptables (45-96%) para todos los plaguicidas en los tres suelos, excepto para malatión y malaoxón en los suelos forestal y ornamental. Los LODs obtenidos son similares o incluso menores que los obtenidos por otros métodos previamente descritos en la bibliografía, en el rango 0,48-7,78 ng/g.
- La validación del método demostró su aplicación satisfactoria al análisis cuantitativo de este grupo de plaguicidas en muestras de suelo enriquecidas, obteniendo niveles de exactitud altos. Además, se aplicó para la determinación de clorpirifos en un suelo utilizado para el cultivo de papas tratado con dicho plaguicida, observando una clara acumulación del mismo a lo largo del tiempo.

IV.5.- EXTRACCIÓN SIMULTÁNEA DE PLAGUICIDAS Y METABOLITOS EN SUELOS MEDIANTE MICROEXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA UTILIZANDO LÍQUIDOS IÓNICOS COMO DISOLVENTES DE EXTRACCIÓN Y CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN CON DETECCIÓN POR FLUORESCENCIA

En la presente sección se optimizó un procedimiento basado en la utilización de la IL-DLLME para la extracción de un grupo de plaguicidas (carbendazima/benomilo, tiabendazol, fuberidazol, carbaril y triazofos) y algunos de sus metabolitos más importantes (2-aminobenzimidazol, metabolito de la carbendazima, y 1-naftol, metabolito del carbaril) en suelos. Los factores que afectan al procedimiento de IL-DLLME se optimizaron mediante un diseño experimental, utilizando [HMIm][PF₆] como disolvente de extracción. Los analitos fueron inicialmente extraídos de los suelos mediante UAE. La validación del método UAE-[HMIm][PF₆]-DLLME y posterior determinación mediante HPLC-FD se llevó a cabo realizando calibrados y estudios de precisión y exactitud para cuatro tipos de suelo con diferentes características fisicoquímicas (forestal, ornamental, de jardín y lapilli). Posteriormente, se sintetizó y purificó el IL disimétrico [PPIm][PF₆], y se empleó por primera vez como disolvente de extracción en IL-DLLME. En este caso, y con fines comparativos, el IL se utilizó prácticamente con las condiciones de extracción anteriormente desarrolladas para el análisis de los mismos analitos. La metodología también fue validada para dos de los suelos utilizados anteriormente (forestal y de jardín). Este trabajo constituye la primera aplicación de la IL-DLLME para la extracción de analitos orgánicos de suelos, y la primera vez que el grupo de plaguicidas seleccionado, así como sus metabolitos, fue simultáneamente analizado mediante HPLC-FD.

IV.5.1.- ANTECEDENTES

La detección por fluorescencia en HPLC es de las más selectivas y sensibles, aunque en este campo se ha visto limitada fundamentalmente por el hecho de que muy pocos plaguicidas muestran fluorescencia nativa (COLY Y AARON, 1998). En este sentido, y en lo que respecta al análisis de plaguicidas mediante HPLC utilizando detección por fluorescencia directa, sólo se ha aplicado a un número reducido de familias. Entre ellas, cabe destacar los benzimidazoles, como la carbendazima (BUSHWAY Y COLS., 1991) o el tiabendazol (MOTOHASHI Y COLS., 1991), las cumarinas como warfarina, bromadiolona, difenacoum, brodifacum y cumatetralil (FELICE Y COLS., 1991),

algunos carbamatos como aminocarb (BRUN Y MACDONALD, 1980), carbofurano y carbaril (KRAUSE, 1983), ciertos OPPs como cumafós (KRAUSE, 1983) y triazofos (FU Y COLS., 2009), ácidos ariloxialcanoicos como mecoprop, MCPA y MCPB (SCHUSSLER, 1990) y fenoles como el 2-fenoxifenol (MOTOHASHI Y COLS., 1991). En lo que respecta al análisis de suelos, sólo habían sido determinados benomilo, fuberidazol (WU Y COLS., 2009a), carbendazima y tiabendazol (HALKO Y COLS., 2006; WU Y COLS., 2009a) en dos ocasiones y carbaril y triazofos en otra (FU Y COLS., 2009).

Hasta el momento del desarrollo de este trabajo, la DLLME había sido utilizada para la extracción de compuestos orgánicos de suelos en muy pocas ocasiones (XIONG Y HU., 2008; WU Y COLS., 2009a, 2009b; FU Y COLS., 2009; HU Y COLS., 2009b). Dicho número era todavía más reducido (sólo cuatro trabajos) cuando se trataba de la extracción de plaguicidas (XIONG Y HU., 2008; WU Y COLS., 2009a, 2009b; FU Y COLS., 2009). Concretamente, en el trabajo de Xiong y Hu (2008) se determinó un grupo de seis plaguicidas (malatión, clorpirifos, buprofezín, triazofos, carbosulfán y piridabén) en un tipo de suelo, así como en aguas y bebidas, mientras que en el trabajo de Fu y cols. (2009) se extrajeron solamente dos plaguicidas (carbaril y triazofos) de tres tipos de suelo. En ambos trabajos se utilizaron tetracloruro de carbono y MeOH como disolventes de extracción y dispersión, respectivamente, después de realizar una extracción previa del suelo. En el primer caso, se llevó a cabo con agua, que luego se utilizó como fase acuosa en la etapa de DLLME, mientras que en el segundo con MeOH, que más tarde se utilizó como disolvente de dispersión. Otro ejemplo es el trabajo de Wu y cols. (2009a), en el que se usó una mezcla de acetona y NaHCO₃ para extraer un grupo de cuatro sulfonilureas de un tipo de suelo y, posteriormente, tras una etapa de limpieza mediante dSPE con C₁₈, se añadió clorobenceno como disolvente de extracción, de forma que la acetona actuaba como disolvente de dispersión. Finalmente, en el último de estos trabajos, desarrollado también por el anterior grupo de investigación (WU Y COLS., 2009b) se extrajeron tan solo dos plaguicidas (carbendazima y tiabendazol) de dos tipos de suelo mediante una disolución de HCl que, tras un ajuste adecuado del pH, se sometió al procedimiento de DLLME con una mezcla de cloroformo y THF como disolventes de extracción y dispersión, respectivamente.

Como se comentó en el Capítulo I, los ILs poseen una buena capacidad de extracción de un gran número de analitos orgánicos, siendo una alternativa a los

disolventes convencionales. En el caso particular de la DLLME, durante los últimos años su uso en este campo ha despertado un gran interés (REZAEI Y COLS., 2010; PINTO Y COLS., 2010). Sin embargo, el número de ILs que pueden ser utilizados en este sentido está muy limitado, pues además de poseer una alta capacidad de extracción, tienen que poseer una densidad superior a la del agua y una baja solubilidad en la misma.

Una de las familias de ILs más conocidas y estudiadas hasta este momento son las sales de 1,3-alquilimidazolio. Si bien la razón por la que estas sales tienen un bajo punto de fusión todavía no se conoce exactamente, se cree que la asimetría del catión juega un papel importante en el empaquetamiento (LARSEN Y COLS., 2000). En DLLME, el uso de esta familia de ILs es relativamente frecuente, especialmente los asimétricos hexafluorofosfatos de 1-alquil-3-metilimidazolio [RMIm][PF₆]. En este sentido, el más utilizado ha sido el hexafluorofosfato de 1-hexil-3-metilimidazolio [HMIm][PF₆] (ZHOU Y COLS., 2008a; LIU Y COLS., 2009b; MAO Y COLS., 2009; WANG Y COLS., 2010; GAO Y COLS., 2010), seguido del hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazolio [BMIm][PF₆] (FAN Y COLS., 2008, 2009; CRUZ-VERA Y COLS., 2009; BERTON Y COLS., 2010; HUANG Y COLS., 2011), ambos comercialmente disponibles. Otros ILs de la misma familia que han sido utilizados, aunque en un menor número de ocasiones, son el hexafluorofosfato de 1-octil-3-metilimidazolio [OMIm][PF₆] (HE Y COLS., 2009; PEÑA Y COLS., 2009), el 1-butil-3-metilimidazolio bis(trifluorometilsulfonil)amida [BMIm][NTf₂] (YAO Y ANDERSON, 2009), el 1-hexil-3-metilimidazolio bis(trifluorometilsulfonil)amida [HMIm][NTf₂] (GHAREHBAGHI Y SHEMIRANI, 2011) o el 1-octil-3-metilimidazolio bis(trifluorometilsulfonil)amida [OMIm][NTf₂] (ABDOLMOHAMMAD-ZADEH Y SADEGHI, 2009). Todos ellos poseen una densidad más elevada que la del agua y una baja solubilidad en la misma.

Inicialmente se suponía que las sales de 1,3-dialquilimidazolio con sustituyentes simétricos serían ILs pobres (DZYUBA Y BARTSCH, 2001), porque el empaquetamiento resultaría más efectivo. Sin embargo, la realidad es que los hexafluorofosfatos de 1,3-dialquilimidazolio con sustituyentes simétricos del dimetil al dodecil son, sorprendentemente, RTILs (DZYUBA Y BARTSCH, 2001). En lo que respecta a su uso en DLLME, solamente el hexafluorofosfato de 1,3-dibutilimidazolio [BBIm][PF₆] se había utilizado para la extracción de plaguicidas (cuatro OPPs, *i.e.*, fenitrotión, paratión, fentión y foxim) de aguas y extractos de fruta (HE Y COLS., 2010). Dado el número escaso de aplicaciones en este sentido, la síntesis de ILs con diferentes propiedades y capacidades de extracción, apropiados para su uso en

DLLME, así como para la extracción de diferentes tipos de analitos, sobre todo de matrices complejas, es altamente deseable.

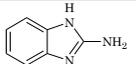
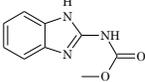
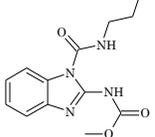
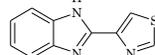
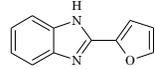
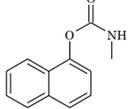
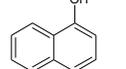
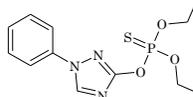
En general, el número de trabajos que utilizan ILs como disolventes de extracción en DLLME es relativamente bajo, en particular aquellos en los que se describe la extracción de analitos orgánicos de muestras diferentes a las aguas (REZAAE Y COLS., 2010; PINTO Y COLS., 2010). Hasta el momento en el que se desarrolló el presente trabajo, la IL-DLLME no se había aplicado nunca a la extracción de plaguicidas de extractos de suelos, ni siquiera para otro tipo de analitos. Por tanto, considerando la complejidad de dichas muestras, era de gran interés desarrollar trabajos en este sentido, con objeto de incrementar la selectividad en el proceso extractivo evitando el uso de disolventes más contaminantes.

El grupo de compuestos seleccionado para este estudio está formado por cuatro plaguicidas pertenecientes a la familia de los benzimidazoles (carbendazima/benomilo, tiabendazol y fuberidazol), que son productos utilizados desde los años 1960s como fungicidas pre- y postcosecha. Además, también se incluyó un carbamato (carbaril), que es un insecticida y un regulador de crecimiento de las plantas, un OPP (triazofos), que puede actuar como insecticida, acaricida o nematocida, y dos productos clave de degradación en suelos (2-aminobenzimidazol, metabolito de la carbendazima, y 1-naftol, metabolito del carbaril). Todos ellos poseen fluorescencia nativa y, por tanto, se puede aplicar la detección por fluorescencia sin derivatización, lo que permite una detección más sensible y selectiva respecto a la UV-Vis. Por otro lado, y dado que la IL-DLLME no había sido utilizada hasta el momento para la extracción de analitos orgánicos de muestras de suelo, se propone su utilización en este campo con ILs alternativos.

IV.5.2.- SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA MEDIANTE HPLC-FD

La Tabla IV.5.1 muestra las estructuras, familias y algunas de las propiedades del grupo de analitos seleccionado para este estudio. Como se puede observar, algunos de ellos presentan una movilidad baja en el suelo (aquellos que poseen valores de K_{oc} altos), así como una persistencia moderada (los que poseen valores de DT_{50} elevados), lo que pone de manifiesto la importancia de su análisis en este tipo de matrices.

Tabla IV.5.1.- Estructuras y propiedades de los analitos utilizados para este estudio.

| Analito (familia) | Estructura | Actividad | pK _a | Solubilidad en agua (mg/L, 20 °C) | DT ₅₀ típico (días) | Log K _{ow} | K _{oc} (mL/g) |
|------------------------------------|--|-------------------------------------|---|-----------------------------------|--------------------------------|---------------------|------------------------|
| 2-Aminobenzimidazol (benzimidazol) |  | - | 7,39 ^{a)} | - | - | 0,91 | 22 |
| Carbendazima (benzimidazol) |  | Fungicida | 4,20 ^{a)} | 8 | 260 | 1,48 | 223 |
| Benomilo (benzimidazol) |  | Fungicida | 4,48 ^{a)} | 2 | 0,8 | 1,4 | 1900 |
| Tiabendazol (benzimidazol) |  | Fungicida | 4,73 ^{a)} y 12,0 ^{a)} | 30 | 365 | 2,39 | 2500 |
| Fuberidazol (benzimidazol) |  | Fungicida | 4,00 ^{a)} | 71 | 24,6 | 2,71 | 605 |
| Carbaril (carbamato) |  | Insecticida | 10,4 | 9,1 | 16 | 2,36 | 211 |
| 1-Naftol (fenol) |  | - | 9,34 | 866 | 0,53 | 2,85 | 245 |
| Triazofos (OPP) |  | Insecticida, acaricida y nematocida | - | 35 | 44 | 3,55 | 358 |

- Datos no encontrados/No aplicable. pK_a: constante de disociación ácida. DT₅₀: tiempo de semidesintegración o vida media. K_{ow}: coeficiente de partición octanol/agua. K_{oc}: coeficiente de adsorción de carbono orgánico del suelo (FOOTPRINT, IUPAC). a) Valor de pK_a como base débil.

Los valores de pK_a de los analitos de estudio oscilan entre 4 y 12, por lo que las condiciones de separación deben ser cuidadosamente optimizadas. Cabe destacar, además, que el benomilo es muy inestable en medio alcalino y se convierte rápidamente en carbendazima (MALLAT Y COLS., 1997). De hecho, cuando se llevó a cabo la identificación de los analitos, se observó que ambos eluían con el mismo tiempo de retención. Por ello, se prefirió determinarlos conjuntamente como carbendazima/benomilo, tal como sugiere la legislación europea en el Reglamento (UE) N° 915/2010 de la Comisión de 12 de octubre de 2010.

La separación completa de todos los analitos se consiguió utilizando 100% de ACN como fase móvil A y 100% de una disolución 10 mM de fosfato a pH 8,70 como fase móvil B. Se realizaron pruebas tanto en régimen isocrático como en gradiente con diferentes composiciones de la fase móvil y valores de pH, obteniendo finalmente el programa de gradiente óptimo descrito en la Tabla III.2 correspondiente a la Parte Experimental de esta Tesis, que proporcionó una adecuada separación con buenas eficacias y tiempos de análisis inferiores a 18 min. Debido al elevado valor de pK_a como base débil correspondiente al 2-aminobenzimidazol ($pK_a = 7,39$), fue necesario establecer un pH alto para evitar su adsorción en la fase estacionaria. Por otra parte, la elución en régimen isocrático no fue adecuada, debido a los largos tiempos de retención y a las bajas eficacias obtenidas, especialmente para los compuestos con tiempos de retención más altos (carbaril, 1-naftol y triazofos).

A continuación, se determinaron las longitudes de onda de máxima excitación y emisión para cada analito, realizando diferentes barridos en los que una de las dos longitudes de onda se mantenía constante. El programa final seleccionado se muestra en la Tabla III.3. Es importante destacar que ocasionalmente se producían ligeros saltos en la línea base cuando se modificaban las longitudes de onda, sobre todo debido a la proximidad de los picos correspondientes a carbaril y 1-naftol, de ahí que el detector se programara en modo multicanal para obtener un segundo cromatograma. La Figura IV.5.1 muestra la separación de los siete analitos en las condiciones de separación óptimas.

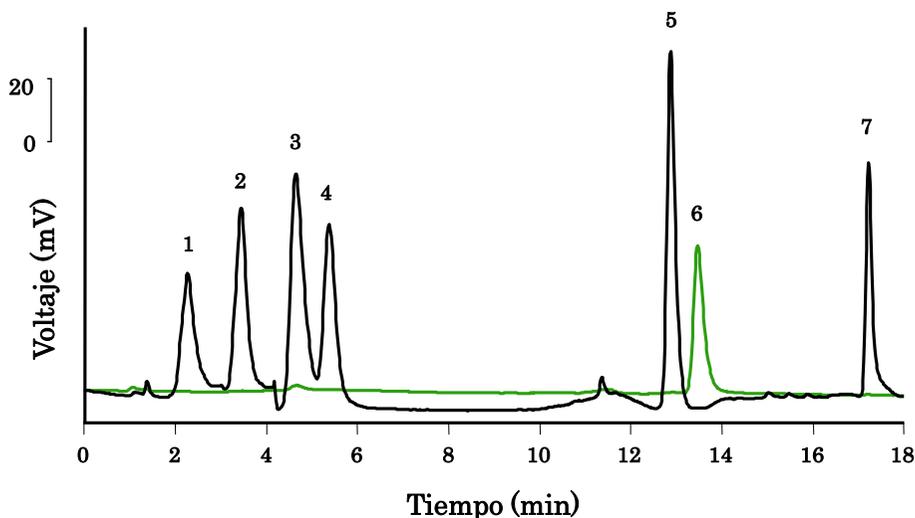


Figura IV.5.1.- Cromatograma HPLC-FD de los analitos de interés a sus longitudes de onda de máxima excitación y emisión. Velocidad de flujo: 1 mL/min. Volumen de inyección: 20 μ L. Muestra disuelta en 59:41 (v/v) ACN/10 mM fosfato a pH 8,70. Concentración: 2-aminobenzimidazol (125 μ g/L), carbendazima/benomilo (620 μ g/L), tiabendazol (125 μ g/L), fuberidazol (2,21 μ g/L), carbaril (130 μ g/L), 1-naftol (130 μ g/L), triazofos (125 μ g/L). (1) 2-aminobenzimidazol, (2) carbendazima/benomilo, (3) tiabendazol, (4) fuberidazol, (5) carbaril, (6) 1-naftol y (7) triazofos.

IV.5.2.1.- ESTUDIO DE REPETIBILIDAD Y CALIBRADO INSTRUMENTAL

Una vez optimizada la separación, se realizó un estudio de repetibilidad, inyectando dos niveles de concentración (de aproximadamente 10 y 100 μ g/L) cinco veces en el mismo día ($n = 5$) durante tres días consecutivos ($n = 15$). Asimismo, se obtuvieron las curvas de calibrado para cada analito, inyectando siete concentraciones diferentes ($n = 7$) por triplicado.

Como se puede observar en la Tabla IV.5.2, se obtuvo una buena repetibilidad dentro del mismo día, con RSDs que oscilaron entre 0,1 y 0,3% para los tiempos de retención y entre 0,7 y 3,7% para las áreas de pico. Entre días, se obtuvieron RSDs entre 0,1 y 0,8%, y 1,9 y 4,8%, respectivamente. Por otra parte, se alcanzaron coeficientes de determinación (R^2) de 0,999 para todos los analitos. Los LODs instrumentales, calculados como la concentración que proporcionaba una relación S/N de 3, oscilaron entre 0,02 μ g/L para el fuberidazol y 6,53 μ g/L para la carbendazima/benomilo, mientras que los LOQs, calculados como la concentración que proporcionaba una relación S/N de 10, se encontraron entre 0,08 y 21,8 μ g/L, para los mismos plaguicidas, respectivamente.

Tabla IV.5.2.- Estudio de repetibilidad y calibrado instrumental del método HPLC-FD desarrollado.

| Analito | Precisión en el mismo día ($n = 5$) | | Precisión entre días ($n = 15$, tres días) | | Rango lineal ($\mu\text{g/L}$) | $b \pm t S_b$ | $a \pm t S_a$ | R^2 | LOD ^{a)} ($\mu\text{g/L}$) |
|-----------------------|---------------------------------------|----------|--|----------|----------------------------------|---|---|-------|---------------------------------------|
| | t_R | A | t_R | A | | | | | |
| | (RSD, %) | (RSD, %) | (RSD, %) | (RSD, %) | | | | | |
| 2-Aminobenzimidazol | 0,3 | 3,5 | 0,8 | 4,2 | 5,0-500 | $6,53 \times 10^4 \pm 0,16 \times 10^4$ | $-27,7 \times 10^4 \pm 38,8 \times 10^4$ | 0,999 | 1,28 |
| Carbendazima/Benomilo | 0,1 | 3,7 | 0,8 | 4,2 | 25-2500 | $1,68 \times 10^4 \pm 0,02 \times 10^4$ | $11,8 \times 10^4 \pm 21,2 \times 10^4$ | 0,999 | 6,53 |
| Tiabendazol | 0,1 | 3,7 | 0,4 | 3,6 | 5,0-500 | $1,31 \times 10^4 \pm 0,17 \times 10^4$ | $-28,9 \times 10^4 \pm 41,9 \times 10^4$ | 0,999 | 1,04 |
| Fuberidazol | 0,1 | 2,1 | 0,5 | 4,0 | 0,09-9,0 | $543 \times 10^4 \pm 3 \times 10^4$ | $-6,15 \times 10^4 \pm 13,81 \times 10^4$ | 0,999 | 0,02 |
| Carbaril | 0,0 | 1,9 | 0,1 | 1,9 | 5,0-530 | $11,3 \times 10^4 \pm 0,2 \times 10^4$ | $-4,19 \times 10^4 \pm 54,10 \times 10^4$ | 0,999 | 1,04 |
| 1-Naftol | 0,1 | 0,7 | 0,6 | 3,3 | 5,0-500 | $6,42 \times 10^4 \pm 0,05 \times 10^4$ | $-13,1 \times 10^4 \pm 12,9 \times 10^4$ | 0,999 | 1,08 |
| Triazofos | 0,1 | 2,1 | 0,1 | 4,8 | 5,0-550 | $6,06 \times 10^4 \pm 0,05 \times 10^4$ | $-4,42 \times 10^4 \pm 12,91 \times 10^4$ | 0,999 | 1,35 |

a) Calculado como la concentración capaz de proporcionar una relación S/N de 3. 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^2 : coeficiente de determinación ($n = 7$).

IV.5.3.- PROCEDIMIENTO IL-DLLME UTILIZANDO [HMIm][PF₆]

IV.5.3.1.- OPTIMIZACIÓN DEL PROCEDIMIENTO

A partir de una profunda revisión bibliográfica sobre la aplicación de la IL-DLLME, se puede deducir que el [HMIm][PF₆] ha sido el IL más utilizado en el campo del análisis de plaguicidas. Por esta razón, también ha sido considerado para el presente estudio. Por otra parte, hay que tener en cuenta que el disolvente de dispersión debe ser miscible tanto con el disolvente de extracción como con el agua, para permitir la formación de la correspondiente microemulsión. Para ello se seleccionó el MeOH, en lugar de otros disolventes comúnmente utilizados como el ACN o la acetona (REZAAE Y COLS., 2010). En el caso del ACN, en el que el IL es altamente soluble, se observó una total miscibilidad entre el sistema agua-IL-disolvente de dispersión, lo que impedía la formación de la gota sedimentada tras la etapa de centrifugación (LIU Y COLS., 2009b). Por el contrario, la acetona no proporcionó buenas eficacias de extracción, obteniendo una menor recuperación de los analitos respecto al uso del MeOH.

Una vez seleccionados los disolventes de extracción y dispersión, y con el objetivo de establecer los niveles de los factores que se utilizarían posteriormente para el diseño experimental, se llevaron a cabo diversos experimentos preliminares por duplicado variando el pH de la muestra, la cantidad de NaCl añadida a la misma, el volumen de MeOH como disolvente de dispersión y la cantidad de [HMIm][PF₆].

Dado que el procedimiento de DLLME se debe realizar con una muestra acuosa, se tomaron inicialmente 10 mL de agua Milli-Q enriquecida (100 µg/L) a diferentes valores de pH (3,0, 6,0, 8,0 y 10,0) a los que se le añadieron rápidamente, y mediante una micropipeta, 90 mg de [HMIm][PF₆] previamente disueltos en 700 µL de MeOH. En ninguno de estos casos se adicionó NaCl al agua. En la Figura IV.5.2 se muestran los resultados obtenidos, observando que el efecto del pH era irregular. Dado que un pH de 8,0 proporcionó un aumento de la eficacia de la extracción para la mayoría de los analitos, sobre todo para triazofos, carbaril y 1-naftol, este valor fue seleccionado para continuar los experimentos preliminares, aunque posteriormente este efecto sería estudiado en profundidad mediante el correspondiente diseño experimental. Valores de pH superiores ocasionaron una

disminución drástica de las áreas, sobre todo, también, para triazofos, carbaril y 1-naftol.

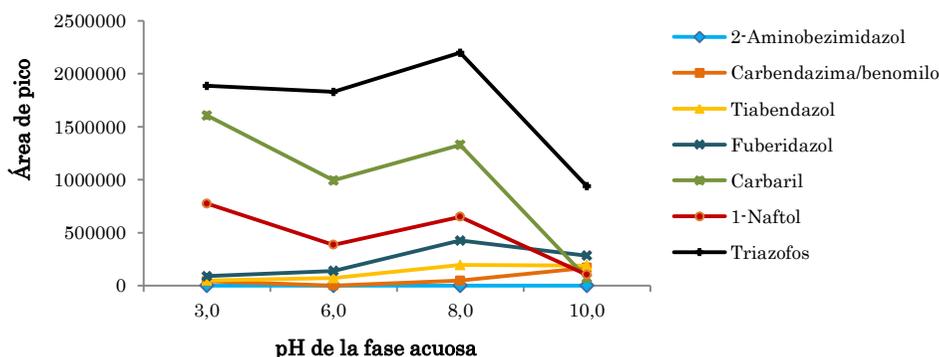


Figura IV.5.2.- Efecto de la variación del pH de la fase acuosa en la eficacia de extracción. Concentración: aprox. 100 $\mu\text{g/L}$. Condiciones experimentales: 0% (p/v) NaCl, 700 μL de MeOH, 90 mg [HMIm][PF₆], 10 mL de agua Milli-Q enriquecida (aproximadamente 100 $\mu\text{g/L}$) y centrifugación a 4400 rpm durante 20 min.

A continuación, se tomaron 10 mL de agua Milli-Q a pH 8,0 conteniendo diferentes cantidades de NaCl (0, 15, 20 y 25% (p/v)) con el objetivo de estudiar el efecto de *salting-out*. El resto de condiciones experimentales fueron idénticas a las del procedimiento de DLLME anterior. La Figura IV.5.3 muestra los resultados obtenidos, en los que se puede apreciar claramente que al aumentar la fuerza iónica del medio se producía una evidente mejoría en la extracción de todos los analitos. Por tanto, se preseleccionó un 25% (p/v) de NaCl en la fase acuosa.

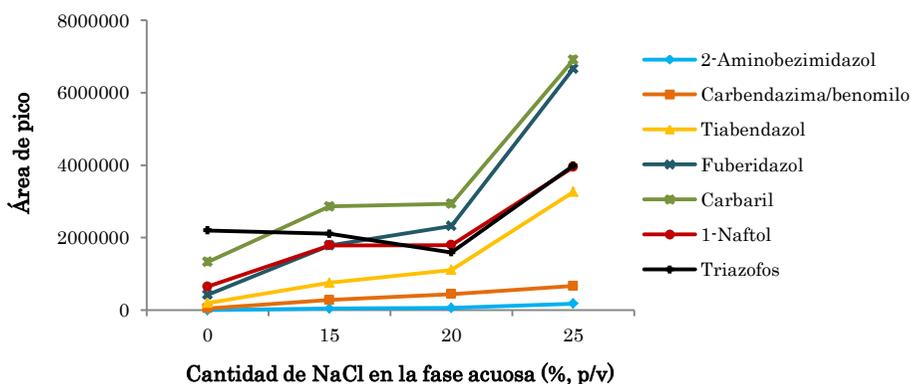


Figura IV.5.3.- Efecto de la variación de la cantidad de NaCl en la fase acuosa en la eficacia de la extracción. Concentración: aprox. 100 $\mu\text{g/L}$. Condiciones experimentales: pH 8,0, 700 μL de MeOH, 90 mg [HMIm][PF₆]. Resto de las condiciones análogas a las de la Figura IV.5.2.

Posteriormente, una disolución de 10 mL de agua Milli-Q a pH 8,0 conteniendo un 25% (p/v) de NaCl se extrajo con 90 mg de [HMIm][PF₆] previamente disuelto en diferentes volúmenes de MeOH (300, 500, 600 y 1000 μL). En la Figura IV.5.4 se puede ver la tendencia observada, donde se deduce que para la mayoría de los analitos, el uso de volúmenes entre 500 y 800 μL mejoraba considerablemente la extracción, por lo que se seleccionó un volumen de 600 μL.

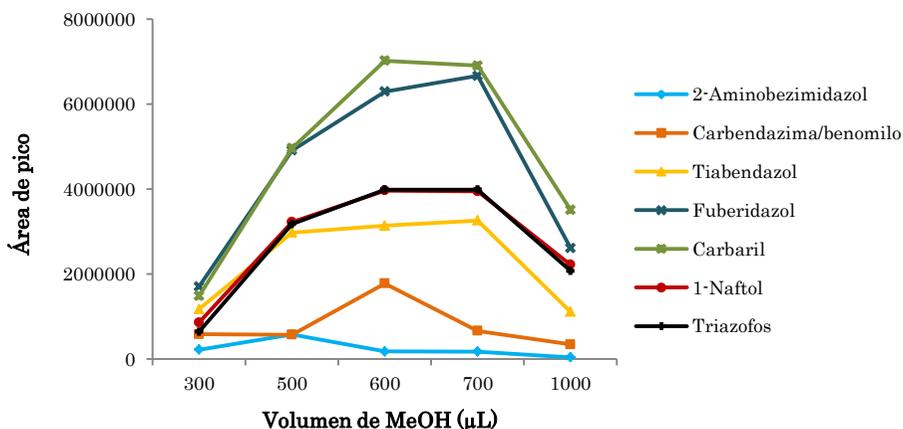


Figura IV.5.4.- Efecto de la variación del volumen de MeOH como disolvente de dispersión en la eficacia de la extracción. Concentración: aprox. 100 μg/L. Condiciones experimentales: pH 8,0, 25% (p/v) NaCl y 90 mg [HMIm][PF₆]. Resto de las condiciones análogas a las de la Figura IV.5.2.

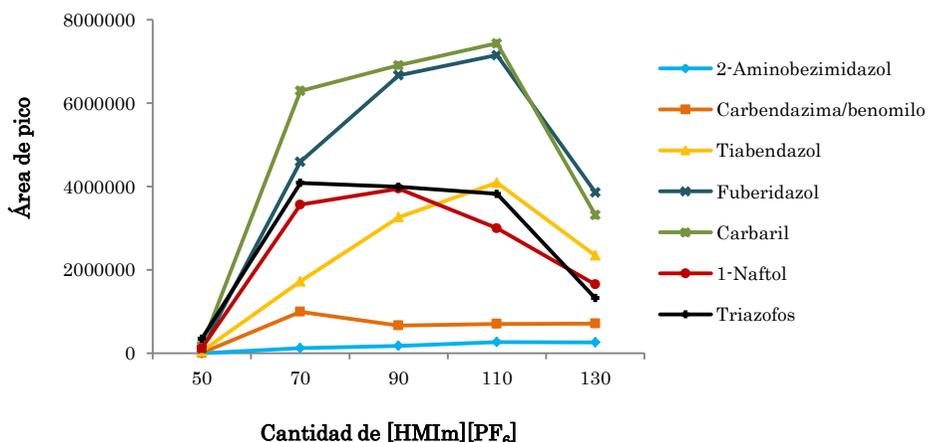


Figura IV.5.5.- Efecto de la variación de la cantidad de [HMIm][PF₆] como disolvente extractor en la eficacia de la extracción. Concentración: aprox. 100 μg/L. Condiciones experimentales: pH 8,0, 25% (p/v) NaCl y 600 μL de MeOH. Resto de las condiciones análogas a las de la Figura IV.5.2.

Por último, se estudió el efecto de la cantidad de [HMIm][PF₆] (50, 70, 90, 110 y 130 mg) realizando el procedimiento de DLLME en las condiciones previamente seleccionadas. Como se puede ver en la Figura IV.5.5, el uso de 110 mg proporcionó, en general, los mejores resultados. Como también se puede observar en estos experimentos así como en todos los anteriores, la eficacia de la extracción para el 2-aminobenzimidazol fue siempre muy baja.

Por otro lado, también se estudió la variación de parámetros como la agitación durante la extracción, así como los tiempos de centrifugación y extracción para fijarlos definitivamente antes de llevar a cabo el diseño experimental. Para ello, se realizaron extracciones por duplicado en las condiciones previamente consideradas (10 mL de agua Milli-Q a pH 8,0 conteniendo un 25% (p/v) de NaCl, extracción con 110 mg [HMIm][PF₆] y 600 µL de MeOH), variando cada uno de los parámetros anteriores.

En lo que respecta a la agitación para asistir la extracción, se consideró que se podría llevar a cabo de diferentes maneras, tal como describen diversos trabajos de DLLME previos (HUANG Y COLS., 2009; FAN Y COLS., 2009). Éste es el caso de la agitación durante varios minutos mediante vortex, ultrasonidos o incluso una reinyección, mediante micropipeta, del sistema trifásico formado una vez que la mezcla de los disolventes de extracción y dispersión ya han sido inyectados. Los dos últimos proporcionaron áreas de pico inferiores cuando se compararon con la ausencia de agitación, mientras que la agitación durante 1 min mediante vortex incrementó ligeramente la extracción, aunque el aumento de este tiempo no proporcionó mejora alguna. De ahí que a partir de ese momento, se considerara este tipo de agitación.

Por otra parte, en lo que se refiere al tiempo de extracción, se llevaron a cabo diversos experimentos esperando entre 0 y 20 min después de añadir el disolvente de extracción previamente disuelto en MeOH y antes de centrifugar la mezcla trifásica. Para todos los analitos, la eficacia de la extracción mejoró tras esperar entre 0 y 5 min. En particular, para la carbendazima/benomilo, este efecto fue mucho más notable cuando el tiempo de extracción se aumentó hasta 8 min (el área era tres veces mayor), por lo que finalmente se optó por considerar este tiempo de extracción.

El tiempo de centrifugación se varió entre 5 y 20 min, a 4400 rpm (3000 x *g*) -velocidad máxima de agitación de la centrífuga-, obteniéndose una sedimentación adecuada de la gota del disolvente de extracción, así como la máxima extracción cuando se realizó una centrifugación de 10 min. Todos estos parámetros (tiempo y tipo de agitación y tiempo de centrifugación) se mantuvieron constantes durante todo el proceso de optimización descrito a continuación.

IV.5.3.1.1.- DISEÑO EXPERIMENTAL

Tras realizar los experimentos previos, se llevó a cabo un diseño experimental compuesto centrado (CCD) para optimizar los cuatro factores experimentales anteriormente estudiados (pH de la muestra, porcentaje de NaCl, volumen de MeOH y cantidad de [HMIm][PF₆]), previendo que podrían existir interacciones entre ellos. Para ello, se consideró llevar a cabo tres réplicas del punto central y fijar una distancia axial de 1,55 (ensayo ortogonal). Así, el pH se varió entre 5,1 y 9,8, el porcentaje de NaCl entre 0 y 30% (p/v), el volumen de MeOH entre 418 y 882 μ L y la cantidad de [HMIm][PF₆] entre 59 y 121 mg, considerando como respuesta la suma de los valores promedio de las áreas de pico. Estos niveles se tomaron teniendo en cuenta los resultados obtenidos previamente. Los 27 experimentos resultantes, en los que 10 mL de agua Milli-Q enriquecida con los analitos (aprox. 100 μ g/L) se sometieron a la DLLME, se llevaron a cabo aleatoriamente, siguiendo el orden establecido al azar por el programa estadístico utilizado para elaborar y analizar el diseño experimental (*Statgraphics Plus* v. 5.1).

Como se comentó anteriormente, los analitos de estudio tienen propiedades fisicoquímicas muy diferentes (pK_a , K_{ow} , etc.), por lo que la selección de las condiciones óptimas de extracción es una tarea complicada y se ha de alcanzar una situación de compromiso. De ahí que los resultados obtenidos se analizaran para todos los analitos y también para cada analito de forma individual.

Cuando la respuesta se estudió para cada analito por separado, en general se pudo observar que concentraciones altas de NaCl y cantidades elevadas de [HMIm][PF₆], así como volúmenes bajos de MeOH favorecían la

extracción. Sin embargo, como se había observado anteriormente, el efecto del pH era bastante irregular: mientras que valores de pH bajos mejoraban la extracción de tiabendazol, fuberidazol, carbaril y triazofos, valores intermedios favorecían la del 1-naftol, y valores más altos mejoraban la extracción de carbendazima/benomilo y 2-aminobenzimidazol.

La Figura IV.5.6 muestra los efectos individuales de los factores para la suma de las áreas de pico de todos los analitos. Como se puede observar, los resultados concuerdan con la tendencia previa comentada para los analitos individuales.

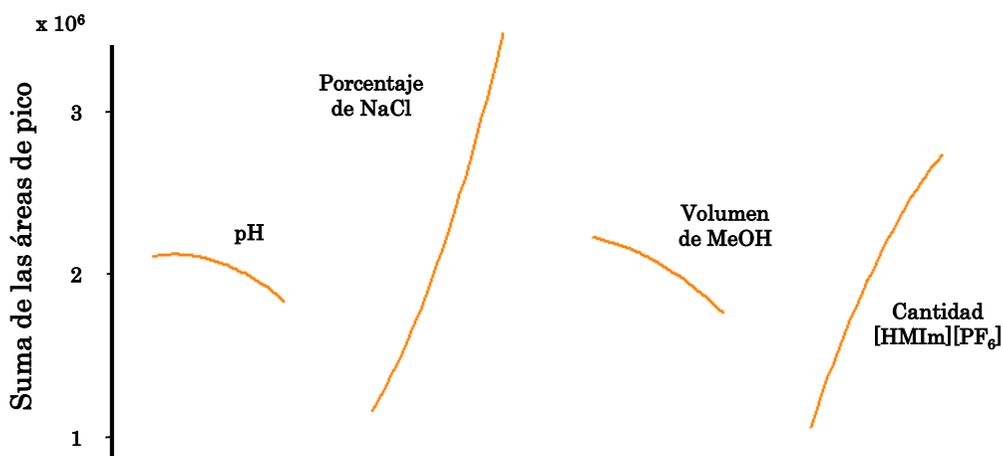


Figura IV.5.6.- Efectos principales de los factores para la suma de las áreas de pico.

Las Figuras IV.5.7 y IV.5.8 muestran las superficies de respuesta estimadas para el CCD cuando se representó el volumen de MeOH vs. la cantidad de [HMIm][PF₆], y el pH vs. el porcentaje de NaCl. De estas figuras, también se pudo deducir claramente que volúmenes bajos de MeOH, así como cantidades elevadas de [HMIm][PF₆] y NaCl proporcionaban una respuesta mayor. De hecho, las condiciones óptimas finales de la DLLME propuestas por el diseño fueron las siguientes: 30% (p/v) de NaCl, 117,5 mg de [HMIm][PF₆], 418 μ L de MeOH y pH 5,20.

A continuación se llevaron a cabo varias extracciones bajo estas condiciones óptimas, obteniendo, efectivamente, un valor máximo para la suma de

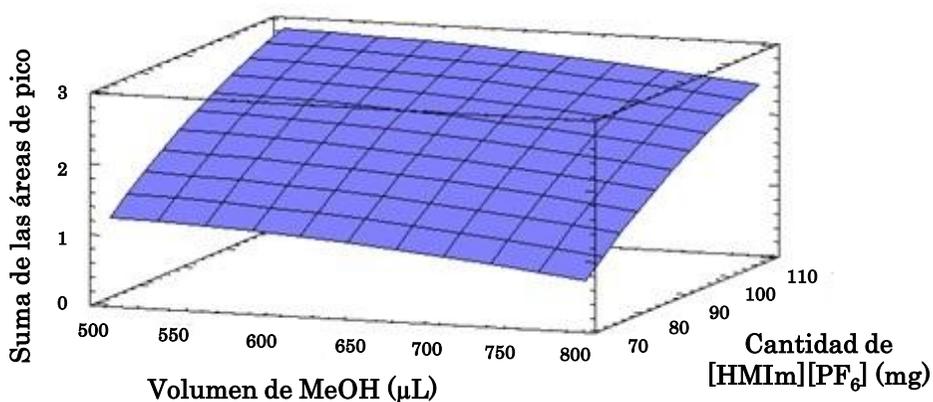


Figura IV.5.7- Superficie de respuesta estimada para el CCD utilizado para la optimización del procedimiento IL-DLLME, representando el volumen de MeOH vs. la cantidad de [HMIm][PF₆]. Resto de las condiciones: pH 7,5 y 15,5% (p/v) NaCl.

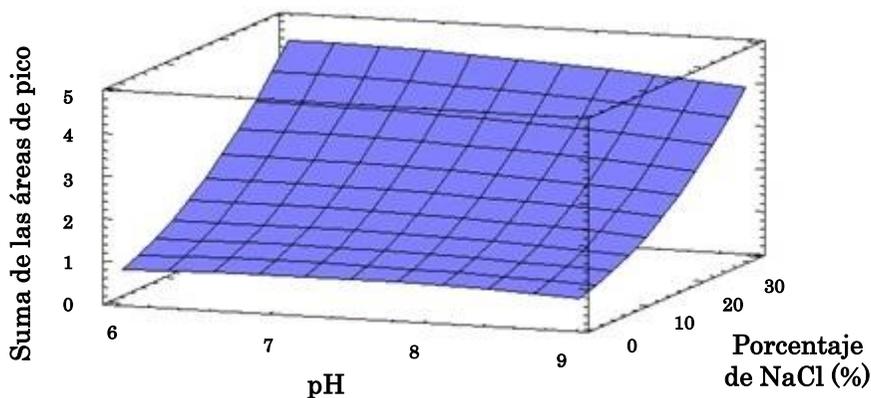


Figura IV.5.8- Superficie de respuesta estimada para el CCD utilizado para la optimización del procedimiento IL-DLLME, representando el pH vs. el porcentaje de NaCl. Resto de las condiciones: 90 mg [HMIm][PF₆] y 650 µL de MeOH.

las áreas de pico, mayor que para cualquiera de las experiencias realizadas hasta ese momento. Además, se realizaron extracciones variando ligeramente cada factor en la proximidad de su valor óptimo (por encima y por debajo), pero se obtuvieron resultados similares en algunos casos o peores en la mayoría de ellos. Estas extracciones se realizaron variando un factor cada vez.

Cabe indicar que cuando se utiliza la LC conjuntamente con la IL-DLLME, se requiere una disolución adecuada del IL sedimentado en la fase móvil inicial. Esto no es algo trivial, dado que puede ser necesario un mayor porcentaje de

disolvente orgánico que podría afectar negativamente a la eficacia cromatográfica. En este sentido, se observó que sólo se obtenían buenas eficacias de pico cuando se utilizaban 1120 μL de una mezcla 59:41 (v/v) de ACN (fase móvil A) y 10 mM de fosfato a pH 8,70 (fase móvil B) para poder disolver los 80 μL de IL recogidos tras la centrifugación. Porcentajes inferiores de ACN no permitían la disolución completa del IL, mientras que porcentajes más elevados no proporcionaban una eficacia adecuada.

IV.5.3.2.- [HMI_m][PF₆]-DLLME-HPLC-FD DE AGUA MILLI-Q

Con el objetivo de comprobar la repetibilidad de la metodología propuesta, se realizó un calibrado del método. Para ello, 10 mL de agua Milli-Q se enriquecieron a ocho niveles de concentración ($n = 8$) y se sometieron al procedimiento IL-DLLME-HPLC-FD previamente optimizado. Se obtuvieron coeficientes de determinación (R^2) superiores a 0,998 para todos los analitos, así como LODs y LOQs en el rango 0,005-5,01 $\mu\text{g/L}$ y 0,020-16,7 $\mu\text{g/L}$, respectivamente (Tabla IV.5.3).

A continuación, 10 mL de agua Milli-Q se enriquecieron a dos niveles de concentración diferentes por quintuplicado para comprobar la precisión y la exactitud del método. Se llevó a cabo un test t de Student para comparar la concentración añadida con la determinada, observando que los valores experimentales de t fueron en todos los casos iguales o menores que el valor de t tabulado (2,78 para $m - 1 = 4$, $\alpha = 0,05$), obteniendo una concordancia entre la concentración añadida y la encontrada entre el 90 y el 119% (Tabla IV.5.4).

IV.5.3.3.- UAE-[HMI_m][PF₆]-DLLME-HPLC-FD DE MUESTRAS DE SUELO

IV.5.3.3.1.- MUESTRAS DE SUELO SELECCIONADAS

Para este trabajo, se seleccionaron cuatro tipos de suelo, ornamental, forestal, de jardín y lapilli, todos ellos recolectados en la isla de Tenerife. La Tabla IV.5.5 muestra algunas de las propiedades disponibles de estos suelos estudiados. En todos los casos, los análisis correspondientes se llevaron a cabo siguiendo los procedimientos descritos en la sección III.6.1.

Tabla IV.5.3.- Calibración del método [HMIm][PF₆]-DLLME-HPLC-FD para agua Milli-Q.

| Analito | Rango lineal (µg/L) | b ± t S_b | a ± t S_a | R² | LOD^{a)} (µg/L) |
|-----------------------|--------------------------------|---|---|----------------------|------------------------------------|
| 2-Aminobenzimidazol | 15-750 | 2,56 x 10 ⁴ ± 0,03 x 10 ⁴ | -0,128 x 10 ⁴ ± 11,641 x 10 ⁴ | 0,999 | 4,06 |
| Carbendazima/Benomilo | 15-600 | 3,55 x 10 ⁴ ± 0,12 x 10 ⁴ | -26,9 x 10 ⁴ ± 38,7 x 10 ⁴ | 0,999 | 5,01 |
| Tiabendazol | 1-40 | 74,5 x 10 ⁴ ± 1,2 x 10 ⁴ | -23,1 x 10 ⁴ ± 24,1 x 10 ⁴ | 0,999 | 0,231 |
| Fuberidazol | 0,015-0,60 | 33,5 x 10 ⁶ ± 19,2 x 10 ⁶ | -2,52 x 10 ⁴ ± 60,37 x 10 ⁴ | 0,998 | 0,005 |
| Carbaril | 1-40 | 86,0 x 10 ⁴ ± 3,0 x 10 ⁴ | -26,7 x 10 ⁴ ± 55,4 x 10 ⁴ | 0,999 | 0,161 |
| 1-Naftol | 1-50 | 39,8 x 10 ⁴ ± 1,7 x 10 ⁴ | -19,7 x 10 ⁴ ± 43,9 x 10 ⁴ | 0,998 | 0,191 |
| Triazofos | 1-50 | 40,4 x 10 ⁴ ± 1,7 x 10 ⁴ | 1,53 x 10 ⁴ ± 41,08 x 10 ⁴ | 0,998 | 0,210 |

a) Calculado como la concentración capaz de proporcionar una relación S/N de 3. b: pendiente. S_b: desviación estándar de la pendiente. a: ordenada en el origen. S_a: desviación estándar de la ordenada en el origen. R²: coeficiente de determinación (n = 8).

Tabla IV.5.4.- Estudio de precisión y exactitud del método [HMIm][PF₆]-DLLME-HPLC-FD para agua Milli-Q.

| Analito | Conc. añadida (µg/L) | Conc. encontrada (µg/L) ^{a)} | Exactitud (%) | <i>t</i> ^{b)} |
|-----------------------|----------------------|---------------------------------------|---------------|------------------------|
| 2-Aminobenzimidazol | 30,0 | 30,4 ± 4,8 | 101 | 0,16 |
| | 375 | 424 ± 5 | 113 | 2,34 |
| Carbendazima/Benomilo | 30,0 | 35,6 ± 11,2 | 119 | 2,36 |
| | 374 | 346 ± 10 | 92 | 0,77 |
| Tiabendazol | 2,00 | 1,93 ± 0,34 | 97 | 0,46 |
| | 25,0 | 22,6 ± 0,3 | 90 | 2,30 |
| Fuberidazol | 0,030 | 0,029 ± 0,019 | 97 | 0,28 |
| | 0,380 | 0,361 ± 0,017 | 96 | 2,34 |
| Carbaril | 2,00 | 1,89 ± 0,57 | 95 | 0,81 |
| | 25,0 | 25,8 ± 0,6 | 103 | 2,10 |
| 1-Naftol | 2,00 | 2,07 ± 1,24 | 104 | 0,52 |
| | 25,0 | 25,2 ± 1,1 | 101 | 0,28 |
| Triazofos | 2,00 | 2,15 ± 1,17 | 108 | 2,21 |
| | 25,0 | 26,0 ± 1,0 | 104 | 1,11 |

a) Media ± intervalo de confianza de cinco extracciones ($m = 5$, $t_{\text{tab}} = 2,78$, $m - 1 = 4$, $\alpha = 0,05$).

Tabla IV.5.5.- Algunas propiedades de los suelos seleccionados.

| Parámetro | Suelo | | | |
|---|----------|--------|------------|---------|
| | Forestal | Jardín | Ornamental | Lapilli |
| Tipo | | | | |
| pH (en agua) | 6,34 | 8,51 | 5,60 | 7,58 |
| pH (en KCl 0,1 N) | 5,26 | 7,64 | 5,03 | 6,19 |
| Humedad (%) | 12,2 | 6,25 | 12,2 | 0 |
| Materia orgánica (%) | 4,79 | 4,57 | 3,91 | 0,27 |
| Conductividad eléctrica a 25 °C (μS/cm) | 0,63 | 2,38 | 3,67 | 0,18 |

Los valores de pH obtenidos indican que el suelo forestal y el ornamental eran ligera y moderadamente ácidos, respectivamente. El primero de ellos seguramente con una gran disponibilidad de nutrientes, mientras que el segundo poseía un valor adecuado de pH para el desarrollo de cualquier tipo de cultivo. Sin embargo, el suelo de jardín era ligeramente alcalino, lo que indicaba la posible presencia de $MgCO_3$ y la deficiencia de Fe para el cultivo. Finalmente, el lapilli (fragmentos piroclásticos generados por erupciones explosivas), como era de esperar, resultó ser moderadamente básico, lo que evidencia la existencia de $CaCO_3$. El contenido de materia orgánica era variable, siendo casi inexistente en éste último suelo.

IV.5.3.3.2.- OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDOS

El uso de la DLLME para matrices sólidas o semisólidas requiere una extracción previa de la muestra, así como una eliminación adecuada del disolvente orgánico y una reconstitución del extracto seco en agua (REZAEI Y COLS., 2010). Para ello, y teniendo en cuenta la experiencia previa descrita en las secciones anteriores, se llevó a cabo la optimización de la extracción del grupo de analitos de estudio. Las extracciones se llevaron a cabo por duplicado, realizando al mismo tiempo un blanco en todos los casos. Inicialmente se llevaron a cabo extracciones utilizando ACN conjuntamente con diferentes sales ($MgSO_4$ monohidratado, NaCl, citrato trisódico dihidratado y hidrogenocitrato disódico sesquihidratado) con y sin la adición de agua, condiciones que habían resultado efectivas para otros plaguicidas y suelos (LESUEUR Y COLS., 2006; KOESUKWIWAT Y COLS., 2008; CHEN Y COLS., 2009). La cantidad de suelo y de sales se varió cuidadosamente, con objeto de maximizar las recuperaciones. Sin embargo, sólo carbaril y

triazofos y, en menor medida, tiabendazol y fuberidazol, se extrajeron bajo las mejores condiciones obtenidas (5 g de suelo, 10 mL de ACN conteniendo 4 g MgSO_4 monohidratado, 1 g NaCl, 1 g de citrato trisódico dihidratado y 0,5 g de hidrogenocitrato disódico sesquihidratado), mientras que el resto de analitos (2-aminobenzimidazol, carbendazima/benomilo y 1-naftol) no se pudieron recuperar en absoluto.

A continuación se realizaron diversas experiencias para estudiar la capacidad extractiva de diferentes disolventes (ACN, MeOH, acetona, acetato de etilo, agua, agua acidulada con HCl y agua alcalinizada con NaOH) o mezclas de ellos, utilizando en todos los casos 10 mL de disolvente y sometiendo a ultrasonidos 5 g de suelo enriquecidos durante 10 min. Cuando se utilizó ACN, se obtuvieron cromatogramas con diversas interferencias, que impedían la correcta determinación de tiabendazol y fuberidazol. Además, ni 2-aminobenzimidazol ni carbendazima/benomilo se extraían, un hecho que también se observó cuando se utilizó acetona. El agua, tanto neutra, acidulada como alcalinizada, mostró una baja capacidad de extracción de los analitos de interés. Además, cuando se utilizó agua a pH alto, se producía la extracción de los ácidos húmicos del suelo, que precipitaban cuando se ajustaba el pH del extracto acuoso a 5,20 para llevar a cabo la etapa de DLLME, dificultando la correcta recolección de la gota de IL. El MeOH, sin embargo, proporcionó cromatogramas limpios y la extracción más efectiva de todos los analitos, excepto para el 2-aminobenzimidazol.

Tras ensayar diversas mezclas de disolventes sin éxito, se procedió a variar el volumen de MeOH (10-25 mL) y la cantidad de suelo extraído (2,5-5,0 g), así como el tiempo de extracción asistida mediante ultrasonidos (5-25 min). Estos estudios demostraron que la utilización de 20 mL de MeOH para extraer 3,0 g de suelo durante 10 min proporcionaron los mejores resultados. El uso de volúmenes mayores de MeOH no mejoró la extracción, mientras que cantidades superiores de suelo disminuyeron la eficacia de la misma, probablemente porque la matriz del suelo impedía que el IL extrajera los analitos de interés.

Con el objetivo de mejorar la eficacia de la extracción, se adicionó NaCl en el rango 0-10% (p/v), produciendo en general un incremento de las áreas de pico, e incluso aumentando la extracción del 2-aminobenzimidazol. Respecto a la

concentración de NaCl, se observó que un 2,5% (p/v) o incluso porcentajes superiores, proporcionaron una extracción máxima, por lo que se seleccionó este valor.

Finalmente, se observó que realizando una doble extracción en las condiciones seleccionadas (UAE con 20 mL de MeOH conteniendo 2,5% (p/v) de NaCl durante 10 min), se obtenían mejores resultados, por lo que la extracción se realizó por duplicado antes de la IL-DLLME.

IV.5.3.3.3.- VALIDACIÓN DEL MÉTODO UAE-[HMI_m][PF₆]-DLLME-HPLC-FD

Una vez optimizado el método descrito, se aplicó a cuatro suelos con propiedades fisicoquímicas diferentes. Para ello, se obtuvo el calibrado del método enriqueciendo muestras de cada suelo a seis niveles de concentración diferentes ($n = 6$). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla IV.5.6. Como se puede observar, la respuesta del detector fue lineal en todo el rango estudiado con coeficientes de determinación (R^2) por encima de 0,996, excepto para el 1-naftol en el suelo ornamental que fue de 0,994. Los LODs y LOQs del método para los cuatro suelos oscilaron, respectivamente, entre 0,02 y 27,1 ng/g y 0,06 y 90,2 ng/g. Estos LODs son del mismo orden de magnitud (ng/g) que los obtenidos frecuentemente en el análisis de plaguicidas en suelos (ANDREU Y PICÓ, 2004). Las ligeras diferencias obtenidas entre unos suelos y otros se pueden atribuir al efecto matriz que afecta directamente a la recuperación de cada analito. De hecho, se llevó a cabo una comparación estadística entre las curvas de calibrado del método para cada suelo y se observó que en todas las posibles combinaciones, existían diferencias significativas, excepto para la carbendazima/benomilo en los suelos forestal y ornamental, y para el tiabendazol en el lapilli y en el suelo de jardín.

La Figura IV.5.9 muestra los cromatogramas, tras aplicar la metodología descrita, de una muestra de suelo de jardín enriquecida (A) y no enriquecida (B). Como se puede observar, no se encontraron interferencias provenientes de la matriz de la muestra, obteniendo cromatogramas similares para los otros tres tipos de suelo.

Uno de los principales inconvenientes del uso de la DLLME con ILs cuando se utiliza detección UV, es la gran absorción que poseen en esta región,

lo que se pone de manifiesto por la existencia de un pico ancho al principio de los cromatogramas. Este hecho se encuentra ampliamente descrito en la bibliografía (BAI Y COLS., 2009; CRUZ-VERA Y COLS., 2009; FAN Y COLS., 2009; HE Y COLS., 2009; LIU Y COLS., 2009b; MAO Y COLS., 2009; PEÑA Y COLS., 2009; YAO Y ANDERSON, 2009) y en algunos casos no afecta a la correcta identificación y cuantificación de los analitos. Sin embargo, tal como se puede observar en los cromatogramas obtenidos, esto es algo que no ocurre cuando se utiliza la detección por fluorescencia, lo que constituye, sin duda alguna, una clara ventaja frente a la detección UV.

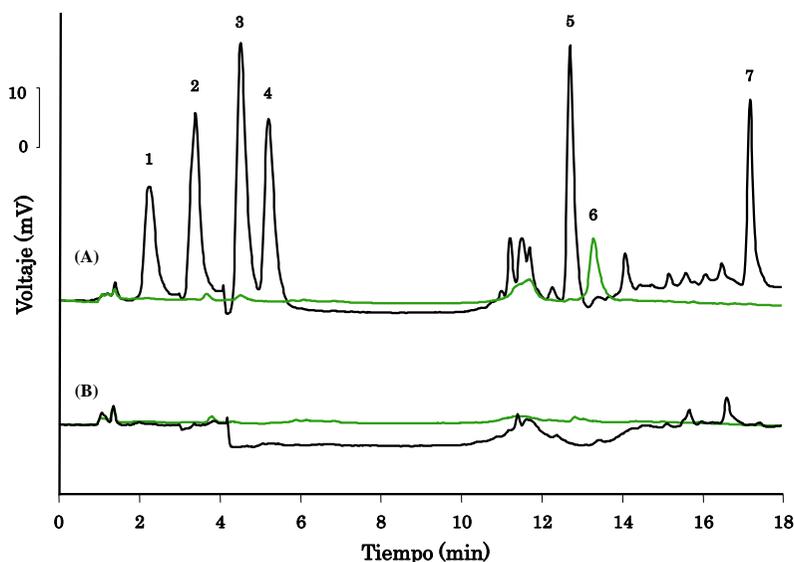


Figura IV.5.9. Cromatograma HPLC-FD tras el procedimiento UAE-[HMIm][PF₆]-DLLME de una muestra de suelo de jardín (A) enriquecida y (B) sin enriquecer. Concentración: 2-aminobenzimidazol (1100 ng/g), carbendazima/benomilo (1000 ng/g), tiabendazol (140 ng/g), fuberidazol (1,40 ng/g), carbaril (50 ng/g), 1-naftol (280 ng/g), triazofos (640 ng/g). Resto de las condiciones análogas a las de la Figura IV.5.1. (1) 2-aminobenzimidazol, (2) carbendazima/benomilo, (3) tiabendazol, (4) fuberidazol, (5) carbaril, (6) 1-naftol y (7) triazofos.

En lo que se refiere a los trabajos previamente publicados y que utilizaban la DLLME convencional (sin ILs) para la extracción de plaguicidas de suelos (XIONG Y HU, 2008; FU Y COLS., 2009; WU Y COLS., 2009a, 2009b), la comparación de los LODs se debe llevar a cabo cuidadosamente, ya que sólo algunos de los analitos considerados en el presente trabajo habían sido previamente analizados y, además, en suelos con características diferentes a los seleccionados en este estudio. En el trabajo de Wu y cols. (2009a), en el que se aplicó un método DLLME-HPLC-FD para extraer sólo dos plaguicidas, carbendazima y

Tabla IV.5.6.- Datos de calibración del método UAE-[HMIm][PF₆]-DLLME-HPLC-FD para los cuatro tipos de suelo.

| Plaguicida | Suelo | Rango lineal (ng/g) | $b \pm t S_b$ | $a \pm t S_a$ | R ² | LOD ^{a)} (ng/g) |
|-----------------------|------------|---------------------|---|---|----------------|--------------------------|
| 2-Aminobenzimidazol | Forestal | 50-3000 | $0,666 \times 10^4 \pm 0,013 \times 10^4$ | $19,6 \times 10^4 \pm 16,8 \times 10^4$ | 0,999 | 14,2 |
| | Jardín | 50-3000 | $0,562 \times 10^4 \pm 0,012 \times 10^4$ | $33,4 \times 10^4 \pm 19,8 \times 10^4$ | 0,999 | 15,5 |
| | Ornamental | 50-3000 | $0,878 \times 10^4 \pm 0,015 \times 10^4$ | $26,8 \times 10^4 \pm 25,1 \times 10^4$ | 0,999 | 13,8 |
| | Lapilli | 50-3000 | $1,10 \times 10^4 \pm 0,03 \times 10^4$ | $20,3 \times 10^4 \pm 45,0 \times 10^4$ | 0,999 | 13,4 |
| Carbendazima/benomilo | Forestal | 50-3000 | $0,896 \times 10^4 \pm 0,012 \times 10^4$ | $9,29 \times 10^4 \pm 15,71 \times 10^4$ | 0,999 | 14,2 |
| | Jardín | 50-3000 | $0,905 \times 10^4 \pm 0,023 \times 10^4$ | $-0,092 \times 10^4 \pm 35,510 \times 10^4$ | 0,999 | 13,9 |
| | Ornamental | 50-3000 | $0,614 \times 10^4 \pm 0,034 \times 10^4$ | $6,92 \times 10^4 \pm 50,70 \times 10^4$ | 0,998 | 14,9 |
| | Lapilli | 50-3000 | $0,778 \times 10^4 \pm 0,031 \times 10^4$ | $-13,5 \times 10^4 \pm 43,7 \times 10^4$ | 0,999 | 15,8 |
| Tiabendazol | Forestal | 4,5-270 | $8,07 \times 10^4 \pm 0,53 \times 10^4$ | $8,24 \times 10^4 \pm 62,11 \times 10^4$ | 0,997 | 1,21 |
| | Jardín | 7-420 | $7,97 \times 10^4 \pm 0,38 \times 10^4$ | $-37,7 \times 10^4 \pm 82,8 \times 10^4$ | 0,998 | 2,05 |
| | Ornamental | 6-360 | $6,34 \times 10^4 \pm 0,35 \times 10^4$ | $51,7 \times 10^4 \pm 64,9 \times 10^4$ | 0,998 | 1,69 |
| | Lapilli | 10-600 | $7,81 \times 10^4 \pm 0,31 \times 10^4$ | $-53,9 \times 10^4 \pm 96,3 \times 10^4$ | 0,999 | 2,77 |
| Fuberidazol | Forestal | 0,07-4,2 | $8,01 \times 10^6 \pm 0,46 \times 10^4$ | $-6,61 \times 10^4 \pm 83,10 \times 10^4$ | 0,998 | 0,02 |
| | Jardín | 0,07-4,2 | $7,42 \times 10^6 \pm 0,13 \times 10^4$ | $-14,2 \times 10^4 \pm 28,8 \times 10^4$ | 0,999 | 0,02 |
| | Ornamental | 0,07-4,2 | $2,79 \times 10^6 \pm 0,21 \times 10^4$ | $12,6 \times 10^4 \pm 48,8 \times 10^4$ | 0,996 | 0,02 |
| | Lapilli | 0,12-7,2 | $6,33 \times 10^6 \pm 0,23 \times 10^4$ | $-68,1 \times 10^4 \pm 74,8 \times 10^4$ | 0,999 | 0,03 |

(Continúa en la página siguiente)

Tabla IV.5.6.- (Continuación)

| Plaguicida | Suelo | Rango lineal (ng/g) | $b \pm t S_b$ | $a \pm t S_a$ | R ² | LOD ^{a)} (ng/g) |
|------------|------------|------------------------|---|---|----------------|-----------------------------|
| Carbaril | Forestal | 2,5-150 | $23,3 \times 10^4 \pm 0,5 \times 10^4$ | $-47,1 \times 10^4 \pm 33,6 \times 10^4$ | 0,999 | 0,641 |
| | Jardín | 2,5-150 | $18,5 \times 10^4 \pm 0,4 \times 10^4$ | $-18,5 \times 10^4 \pm 29,1 \times 10^4$ | 0,999 | 0,630 |
| | Ornamental | 2,5-150 | $17,9 \times 10^4 \pm 0,4 \times 10^4$ | $-16,0 \times 10^4 \pm 32,8 \times 10^4$ | 0,999 | 0,632 |
| | Lapilli | 2,5-150 | $15,5 \times 10^4 \pm 0,6 \times 10^4$ | $11,7 \times 10^4 \pm 45,6 \times 10^4$ | 0,999 | 0,741 |
| 1-Naftol | Forestal | 4-400 | $6,66 \times 10^4 \pm 0,28 \times 10^4$ | $-32,0 \times 10^4 \pm 53,8 \times 10^4$ | 0,999 | 1,12 |
| | Jardín | 14-840 | $0,984 \times 10^4 \pm 0,059 \times 10^4$ | $38,5 \times 10^4 \pm 25,4 \times 10^4$ | 0,998 | 4,00 |
| | Ornamental | 10-600 | $3,59 \times 10^4 \pm 0,34 \times 10^4$ | $-61,8 \times 10^4 \pm 103,1 \times 10^4$ | 0,994 | 2,64 |
| | Lapilli | 8-700 | $4,89 \times 10^4 \pm 0,27 \times 10^4$ | $-89,7 \times 10^4 \pm 99,9 \times 10^4$ | 0,998 | 2,25 |
| Triazofos | Forestal | 35-2000 | $0,736 \times 10^4 \pm 0,029 \times 10^4$ | $-14,0 \times 10^4 \pm 26,4 \times 10^4$ | 0,999 | 10,4 |
| | Jardín | 35-2000 | $0,579 \times 10^4 \pm 0,011 \times 10^4$ | $26,3 \times 10^4 \pm 9,6 \times 10^4$ | 0,999 | 9,20 |
| | Ornamental | 30-1800 | $0,540 \times 10^4 \pm 0,043 \times 10^4$ | $8,78 \times 10^4 \pm 39,81 \times 10^4$ | 0,996 | 8,79 |
| | Lapilli | 92-5500 | $0,400 \times 10^4 \pm 0,021 \times 10^4$ | $-35,7 \times 10^4 \pm 58,7 \times 10^4$ | 0,998 | 27,1 |

a) Calculado como la concentración capaz de proporcionar una relación S/N de 3. b: pendiente. S_b: desviación estándar de la pendiente. a: ordenada en el origen. S_a: desviación estándar de la ordenada en el origen. R²: coeficiente de determinación ($n = 6$).

tiabendazol, el LOD alcanzado para tiabendazol fue del mismo orden (1,6 ng/g) que los obtenidos en este trabajo (1,21-2,77 ng/g), mientras que para la carbendazima (1 ng/g) fue unas 14-16 veces menor (13,9-15,8 ng/g en este trabajo), probablemente debido a las diferencias entre los suelos, que son matrices muy complejas. Por otra parte, en el trabajo de Xiong y Hu (2008), que analizaron seis OSPs por DLLME-GC-FPD, el LOD obtenido para el triazofos (el único analito en común con este trabajo) fue aproximadamente 23 ng/g (los autores sólo proporcionaron el LOD en muestras de agua), que es también similar, y en algunos casos ligeramente superior, al obtenido en el presente trabajo (8,79-27,1 ng/g). Los resultados obtenidos son, además, similares o incluso mejores que los alcanzados para el análisis de algunos de estos analitos en suelos utilizando diferentes técnicas (ITAK Y COLS., 1993; HOGENDOORN Y COLS., 2000; HALKO Y COLS., 2006; PAÍGA Y COLS., 2008; GUI Y COLS., 2008, 2010; LU Y COLS., 2009; CABALLO-LÓPEZ Y COLS., 2009).

Con el objetivo de completar la validación del método y de demostrar su potencial para el análisis de suelos, se llevó a cabo un estudio de precisión y exactitud. Para ello, cada tipo de suelo se enriqueció a dos niveles de concentración diferentes con los analitos de estudio y se sometieron a la metodología UAE-[HMIm][PF₆]-HPLC-FD desarrollada por quintuplicado. La Tabla IV.5.7 muestra los resultados de este estudio, obteniendo para todos los casos, un valor experimental de t menor que el tabulado (2,78 para $m - 1 = 4$, $\alpha = 0,05$), así como una concordancia entre la concentración añadida y la encontrada entre el 80 y 119%, lo que demuestra la repetibilidad y exactitud del método para todos los analitos y para los cuatro tipos de suelo.

IV.5.4.- PROCEDIMIENTO IL-DLLME UTILIZANDO [PPIIm][PF₆]

Como ya se ha señalado anteriormente, son muy pocos los ILs disponibles para su aplicación en DLLME, de ahí que en esta segunda parte se haya estudiado la posible utilización del IL disimétrico [PPIIm][PF₆], que también posee una baja solubilidad en agua y una densidad superior a la misma, como alternativa a los ya utilizados hasta el momento. En este caso particular, inicialmente se sintetizó y se purificó dicho IL para, posteriormente, aplicarlo, utilizando las mismas condiciones de extracción que en el caso del IL anterior, al análisis de dos tipos diferentes de suelos.

Tabla IV.5.7.- Estudio de precisión y exactitud del método UAE-[HMI_m][PF₆]-DLLME-HPLC-FD para los cuatro tipos de suelo.

| Plaguicida | Suelo | Conc. añadida (ng/g) | Conc. encontrada (ng/g) ^{a)} | Exactitud (%) | <i>f</i> ^{b)} |
|-----------------------|------------|----------------------|---------------------------------------|---------------|------------------------|
| 2-Aminobenzimidazol | Forestal | 120 | 135 ± 26 | 112 | 1,40 |
| | | 768 | 783 ± 17 | 102 | 0,61 |
| | Jardín | 137 | 144 ± 35 | 105 | 1,03 |
| | | 880 | 933 ± 31 | 106 | 2,24 |
| | Ornamental | 125 | 110 ± 29 | 88 | 2,73 |
| | | 800 | 732 ± 25 | 91 | 0,94 |
| | Lapilli | 125 | 129 ± 42 | 103 | 0,50 |
| | | 800 | 806 ± 37 | 101 | 0,15 |
| Carbendazima/benomilo | Forestal | 120 | 124 ± 19 | 104 | 1,01 |
| | | 768 | 687 ± 17 | 89 | 1,48 |
| | Jardín | 125 | 125, ± 39 | 100 | 0,04 |
| | | 800 | 777 ± 34 | 97 | 1,32 |
| | Ornamental | 125 | 143 ± 80 | 115 | 2,04 |
| | | 800 | 851 ± 74 | 106 | 2,78 |
| | Lapilli | 130 | 126 ± 58 | 97 | 0,76 |
| | | 832 | 797 ± 51 | 96 | 1,29 |
| Tiabendazol | Forestal | 11,3 | 11,3 ± 8,2 | 101 | 0,04 |
| | | 72,0 | 68,4 ± 7,5 | 95 | 0,56 |
| | Jardín | 17,5 | 20,4 ± 10,4 | 117 | 2,75 |
| | | 112 | 101 ± 9 | 90 | 0,86 |
| | Ornamental | 15,0 | 15,5 ± 10,3 | 103 | 0,19 |
| | | 96,0 | 88,0 ± 9,0 | 92 | 0,74 |
| | Lapilli | 25,0 | 27,3 ± 12,4 | 109 | 1,32 |
| | | 160 | 129 ± 11 | 80 | 2,31 |

| | | | | | |
|-------------|------------|-------|---------------|-----|------|
| Fuberidazol | Forestal | 0,175 | 0,176 ± 0,110 | 100 | 0,06 |
| | | 1,12 | 0,997 ± 0,100 | 89 | 1,34 |
| | Jardín | 0,175 | 0,187 ± 0,040 | 107 | 1,27 |
| | | 1,12 | 1,10 ± 0,03 | 98 | 0,38 |
| | Ornamental | 0,188 | 0,207 ± 0,130 | 111 | 1,16 |
| | | 1,20 | 1,39 ± 0,111 | 115 | 2,06 |
| | Lapilli | 0,300 | 0,346 ± 0,120 | 115 | 2,71 |
| | | 1,92 | 1,68 ± 0,11 | 87 | 2,23 |
| Carbaril | Forestal | 6,25 | 6,72 ± 1,54 | 107 | 2,20 |
| | | 40,0 | 37,2 ± 1,4 | 93 | 2,76 |
| | Jardín | 6,25 | 6,80 ± 1,58 | 109 | 1,00 |
| | | 40,0 | 40,6 ± 1,4 | 102 | 0,36 |
| | Ornamental | 6,25 | 5,31 ± 1,72 | 85 | 1,93 |
| | | 40,0 | 43,0 ± 1,5 | 108 | 1,64 |
| | Lapilli | 7,50 | 7,75 ± 3,03 | 103 | 0,57 |
| | | 48,00 | 44,8 ± 2,7 | 93 | 0,85 |
| 1-Naftol | Forestal | 20,0 | 19,3 ± 8,2 | 97 | 1,55 |
| | | 64,0 | 65,1 ± 7,8 | 102 | 0,56 |
| | Jardín | 88,3 | 105 ± 25 | 119 | 1,01 |
| | | 565 | 550 ± 25 | 97 | 0,43 |
| | Ornamental | 88,3 | 75,7 ± 26,2 | 86 | 2,15 |
| | | 565 | 463 ± 31 | 82 | 2,74 |
| | Lapilli | 88,3 | 95,0 ± 19,1 | 108 | 0,76 |
| | | 565 | 515 ± 21 | 91 | 1,64 |

(Continúa en la página siguiente)

Tabla IV.5.7.- (Continuación)

| Plaguicida | Suelo | Conc. añadida (ng/g) | Conc. encontrada (ng/g) ^{a)} | Exactitud (%) | t^b |
|------------|------------|----------------------|---------------------------------------|---------------|-------|
| Triazofos | Forestal | 87,5 | 102 ± 38 | 117 | 2,73 |
| | | 560 | 512 ± 36 | 91 | 1,40 |
| | Jardín | 80,0 | 75,9 ± 14,3 | 95 | 0,57 |
| | | 512 | 523 ± 13 | 102 | 0,72 |
| | Ornamental | 75,0 | 82,3 ± 73,8 | 110 | 0,81 |
| | | 480 | 493 ± 64 | 103 | 0,75 |
| | Lapilli | 230 | 270 ± 146 | 117 | 1,46 |
| | | 1472 | 1269 ± 129 | 86 | 2,63 |

a) Media ± intervalo de confianza de cinco extracciones ($m = 5$). b) $t_{tab} = 2,78$, $m - 1 = 4$, $\alpha = 0,05$.

IV.5.4.1.- SÍNTESIS Y PURIFICACIÓN DEL [PPIIm][PF₆]

El IL [PPIIm][PF₆] se preparó siguiendo el procedimiento indicado en la sección III.6.5, que es en realidad la primera ruta sintética propuesta para este IL hace ya algunos años por Dzyuba y Bartsch (2001). Brevemente, la síntesis consistió en una alquilación de ambos nitrógenos del imidazolio, haciendo reaccionar este último con NaH en THF y adicionando posteriormente 1-bromopentano para obtener el IL [PPIIm][Br]. A continuación, se realizó un intercambio aniónico o metátesis del bromuro por el hexafluorofosfato, adicionando NaPF₆ al compuesto obtenido anteriormente disuelto en agua.

El espectro ¹H-NMR del [PPIIm][PF₆] en CDCl₃ a 500 MHz fue δ = 0,87 (t, J = 6,8 Hz, 6H, CH₃), 1,32 (m, 8H, CH₃(CH₂)₂N), 1,86 (pent, J = 7,6 Hz, 4H, NCH₂CH₂), 4,15 (t, J = 7,3 Hz, 4H, NCH₂), 7,33 (d, J = 1,6 Hz, 2H, NCHCHN), 8,58 (s, 1H, NCHN), tal como muestra la Figura IV.5.10. Estos resultados coinciden con los obtenidos previamente por Dzyuba y Bartsch (2001).

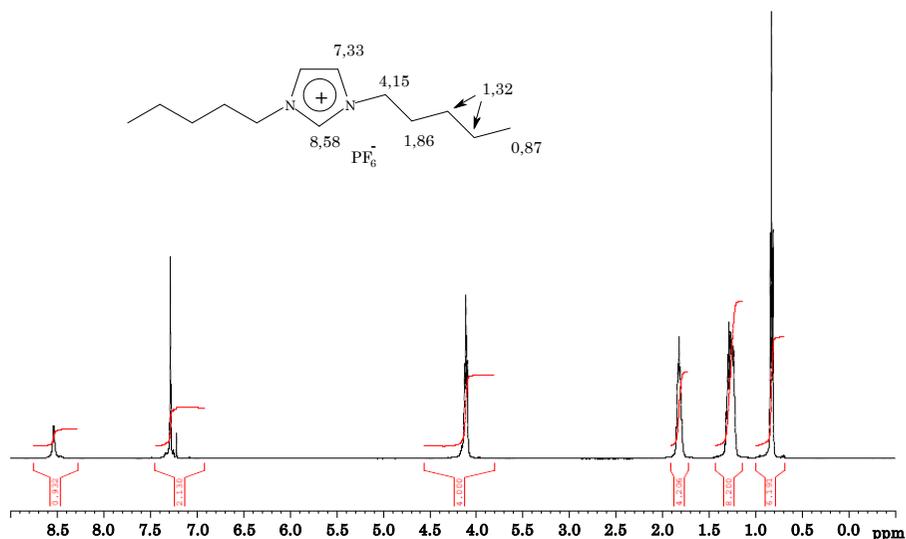


Figura IV.5.10.- Espectro ¹H NMR del [PPIIm][PF₆] en CDCl₃, 500 MHz. Las multiplicidades NMR están abreviadas como s = singlete, d = doblete, t = triplete, pent = pentuplete y m = multiplete. δ = 0,87 (t, J = 6,8 Hz, 6H, CH₃), 1,32 (m, 8H, CH₃(CH₂)₂(CH₂)₂N), 1,86 (pent, J = 7,6Hz, 4H, NCH₂CH₂), 4,15 (t, J = 7,3 Hz, 4H, NCH₂), 7,33 (d, J = 1,6 Hz, 2H, NCHCHN), 8,58 (s, 1H, NCHN).

A pesar de que las impurezas coloreadas que pueden estar presentes en los ILs (sobre todo en los disponibles comercialmente) no deberían afectar a su

comportamiento químico o a sus propiedades físicas, cuando se realizan medidas espectroscópicas, como en este caso, es conveniente disponer del producto con una alta pureza. De hecho, las primeras pruebas realizadas inyectando una pequeña cantidad (20 μL) del IL previamente disuelto en ACN, mostraron la existencia de interferencias cromatográficas importantes con algunos de los analitos de interés (carbendazima/benomilo, carbaril y triazofos), tal como muestra la Figura IV.5.11. Estas interferencias resultaron ser aún mayores al realizar el procedimiento de DLLME, ya que se utilizaba una cantidad más elevada de IL.

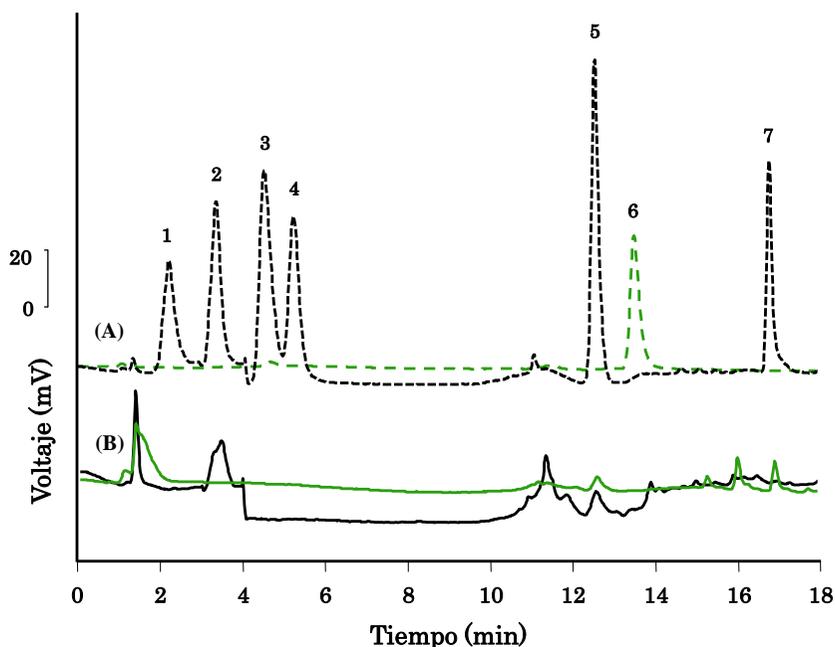


Figura IV.5.11.- Cromatograma HPLC-FD de (A) una mezcla estándar de los analitos de interés y (B) 20 μL del [PPIIm][PF₆] sintetizado y sin purificar disuelto en 1000 μL de ACN. Resto de las condiciones análogas a las de la Figura IV.5.1. (1) 2-Aminobenzimidazol, (2) carbendazima/benomilo, (3) tiabendazol, (4) fuberidazol, (5) carbaril, (6) 1-naftol y (7) triazofos.

Por esta razón, se introdujeron dos variaciones con respecto al método previamente descrito en la bibliografía y que consistieron, simplemente, en purificar tanto el producto intermedio de reacción, [PPIIm][Br], como el final, [PPIIm][PF₆]. Para ello se utilizó, en primer lugar, un método descrito por Earle y cols. (2007), en el que se utilizaba una columna cromatográfica clásica para eliminar impurezas que pudieran contener los ILs para su utilización en aplicaciones espectroscópicas. Los autores afirman que, a pesar de no tratarse de

un método ecológico dadas las altas cantidades de disolvente que se utilizan, en ciertas ocasiones y teniendo en cuenta los pequeños volúmenes de ILs a purificar, es un procedimiento viable e incluso, necesario. En este caso se rellenó una columna de 4 cm de d.i. con 1 cm de arena de mar, 4 cm de gel de sílice, 2 cm de celita y 10 cm de carbón vegetal. A continuación se impregnó toda la columna con DCM y se introdujo el IL, previamente diluido en el mismo disolvente para disminuir su viscosidad. Finalmente, se utilizó más DCM para eluir el IL de la columna y se concentró a vacío. Por otra parte, se llevaron a cabo varios lavados del residuo concentrado con *n*-hexano, para eliminar impurezas orgánicas que, de hecho, mostraban fluorescencia a las longitudes de onda de interés (Figura IV.5.11). Este procedimiento había sido ya previamente descrito por Aniruddha y Anunay (2006).

En general, tanto la síntesis como la purificación para eliminar impurezas cromatográficas, resultó ser altamente repetible.

IV.5.4.2.- PROCEDIMIENTO [PPI_m][PF₆]-DLLME

Una de las formas de evaluar la eficacia de la extracción del IL sintetizado es por comparación con los resultados obtenidos con otro IL, en este caso el [HMI_m][PF₆], bajo las mismas condiciones. Para ello se realizó la extracción con el nuevo IL en las mismas condiciones obtenidas mediante el diseño experimental previo: una mezcla de 117,5 mg de IL y 418 µL de MeOH se inyectó rápidamente en 10 mL de agua Milli-Q que contenían un 30% (p/v) de NaCl.

Como ya se ha comentado, uno de los aspectos que debe ser tenido en cuenta cuando se utiliza un disolvente en DLLME convencional, es que debe tener una densidad más elevada que la del agua. Con el [PPI_m][PF₆], este hecho se verificó cuando el procedimiento de DLLME se realizó con agua Milli-Q pura. Sin embargo, cuando se llevó a cabo con el extracto acuoso proveniente de la UAE de los suelos, la gota del IL no se depositó en el fondo del tubo de centrífuga, sino que permanecía suspendida en la parte superior de la fase acuosa.

La explicación a este hecho podría ser que algunos componentes de la matriz de los suelos provocan un ligero incremento de la densidad de la fase acuosa, pero suficiente para que la gota del IL quede en la parte superior. En

este caso concreto, esta pequeña variación es crítica, debido a que la densidad del [PPIIm][PF₆], determinada experimentalmente y de forma aproximada en este trabajo como 1,17 g/mL a 25 °C, es muy similar a la que tendría la fase acuosa conteniendo un 30% (p/v) de NaCl. En este sentido, en la bibliografía se indica que tanto la densidad como la tensión superficial de los ILs decrece cuando aumenta la longitud de las cadenas alquílicas en el anillo imidazolio (VALDERRAMA Y ZARRICUETA, 2009), por lo que era de esperar que la densidad del [PPIIm][PF₆] fuera menor que la del [HMIIm][PF₆], medida experimentalmente como 1,28 g/mL a 25 °C y que concuerda con el valor encontrado en la bibliografía (HUDELSTON Y COLS., 2001).

Para solucionar este inconveniente y evitar la inversión de la densidad de las fases, se llevaron a cabo algunos experimentos añadiendo cantidades decrecientes de NaCl al extracto acuoso, llegando a la conclusión de que se obtenía una buena sedimentación del IL sólo cuando se adicionaba como máximo un 25% (p/v) de NaCl. Cantidades más elevadas provocaban el efecto anteriormente descrito y la imposibilidad de recolectar el disolvente de extracción de un modo adecuado y repetible.

Otro aspecto importante cuando se considera un disolvente de extracción para DLLME es su solubilidad en agua. En la bibliografía se puede apreciar que la hidrofobicidad de los ILs aumenta con la longitud de las cadenas alquílicas (FREIRE Y COLS., 2007), por lo que la solubilidad del [PPIIm][PF₆] debía ser menor que la del [HMIIm][PF₆], algo que, a priori, es beneficioso para la extracción.

Sin embargo, como ya se ha señalado con anterioridad, cuando se utiliza la LC conjuntamente con la IL-DLLME, se requiere una disolución adecuada del IL. En este sentido, cuando se trabajó con el [PPIIm][PF₆], la composición de la mezcla que finalmente sería inyectada, se tuvo que cambiar con respecto a la utilizada con [HMIIm][PF₆]. Como se indicó previamente, para el [HMIIm][PF₆] fueron necesarios 1120 µL de una mezcla 59:41 (v/v) de fase móvil A:B para disolver los 80 µL del IL sedimentado, proporcionando buenas eficacias de pico (Figura IV.5.9). Sin embargo, cuando se efectuó la misma dilución para el [PPIIm][PF₆], se obtuvieron dos fases, debido a su menor solubilidad en agua. Tras realizar diversas pruebas manteniendo el mismo volumen final para poder comparar los LODs, se obtuvo una dilución adecuada de los 80 µL de fase

sedimentada utilizando 1120 μL de una mezcla 72:28 (v/v) de fase móvil A:B. Aún bajo estas condiciones, las eficacias de pico apenas se vieron afectadas. Es conveniente indicar que, sin embargo, cuando el IL sedimentado se disolvía en ACN puro se obtenían eficacias muy malas.

IV.5.4.3.- [PPI_m][PF₆]-DLLME-HPLC-FD DE AGUA MILLI-Q

La metodología desarrollada con las modificaciones anteriormente descritas para el [PPI_m][PF₆] se validó, en primer lugar, realizando un calibrado del método en agua Milli-Q. Para ello, varias alícuotas de agua Milli-Q enriquecidas a ocho niveles diferentes de concentración ($n = 8$) se sometieron al método descrito en la sección anterior. La Tabla IV.5.8 muestra los resultados obtenidos a este respecto, con coeficientes de determinación (R^2) superiores a 0,998 para todos los analitos y LODs entre 0,005 $\mu\text{g/L}$ para fuberidazol y 5,01 $\mu\text{g/L}$ para carbendazima/benomilo.

A continuación, se realizó el estudio de precisión y exactitud mostrado en la Tabla IV.5.9, enriqueciendo las muestras de agua a dos niveles de concentración diferentes por quintuplicado ($m = 5$). De nuevo en este caso, los valores de t experimentales obtenidos fueron iguales o menores que el valor tabulado (2,78 para $m - 1 = 4$, $\alpha = 0,05$), por lo que no se observaron diferencias significativas entre el valor real y el encontrado. Además, se obtuvo una concordancia entre la concentración añadida y la encontrada entre el 95-115%.

IV.5.4.4.- UAE-[PPI_m][PF₆]-DLLME-HPLC-FD DE MUESTRAS DE SUELO

IV.5.4.4.1.- VALIDACIÓN DEL MÉTODO UAE-[PPI_m][PF₆]-DLLME-HPLC-FD

El método optimizado para el IL propuesto se aplicó a la extracción de los analitos de interés de los suelos forestal y de jardín. La validación se realizó de nuevo mediante un calibrado del método ($n = 6$). Como muestra la Tabla IV.5.10, se obtuvo una buena linealidad para todos los analitos con coeficientes de determinación (R^2) mayores de 0,997. Los LODs oscilaron entre 0,02 y 60,5 ng/g para el suelo forestal y entre 0,02 y 23,3 ng/g para el suelo de jardín, para fuberidazol y 2-aminobenzimidazol, respectivamente. La comparación estadística entre las curvas para cada analito y suelo reveló un claro efecto matriz en todos los casos.

Tabla IV.5.8.- Calibración del método [PPI_m][PF₆]-DLLME-HPLC-FD para agua Milli-Q.

| Analito | Rango lineal (µg/L) | b ± t S_b | a ± t S_a | R² | LOD^{a)} (µg/L) |
|-----------------------|--------------------------------|---|--|----------------------|------------------------------------|
| 2-Aminobenzimidazol | 30-750 | 0,888 x 10 ⁴ ± 0,020 x 10 ⁴ | -5,34 x 10 ⁴ ± 7,55 x 10 ⁴ | 0,999 | 4,06 |
| Carbendazima/Benomilo | 25-750 | 0,975 x 10 ⁴ ± 0,045 x 10 ⁴ | 6,71 x 10 ⁴ ± 16,59 x 10 ⁴ | 0,999 | 5,01 |
| Tiabendazol | 1,5-50 | 42,0 x 10 ⁴ ± 1,8 x 10 ⁴ | -40,0 x 10 ⁴ ± 46,3 x 10 ⁴ | 0,999 | 0,231 |
| Fuberidazol | 0,02-0,75 | 34,1 x 10 ⁶ ± 1,3 x 10 ⁶ | -15,7 x 10 ⁴ ± 52,1 x 10 ⁴ | 0,998 | 0,005 |
| Carbaril | 1-50 | 49,7 x 10 ⁴ ± 1,0 x 10 ⁴ | -13,3 x 10 ⁴ ± 26,9 x 10 ⁴ | 0,999 | 0,161 |
| 1-Naftol | 1-40 | 8,88 x 10 ⁴ ± 1,02 x 10 ⁴ | 9,64 x 10 ⁴ ± 21,13 x 10 ⁴ | 0,998 | 0,190 |
| Triazofos | 1-50 | 25,2 x 10 ⁴ ± 0,7 x 10 ⁴ | -24,3 x 10 ⁴ ± 17,6 x 10 ⁴ | 0,998 | 0,210 |

a) Calculado como la concentración capaz de proporcionar una relación S/N de 3. b: pendiente. S_b: desviación estándar de la pendiente. a: ordenada en el origen. S_a: desviación estándar de la ordenada en el origen. R²: coeficiente de determinación (n = 8).

Tabla IV.5.9.- Estudio de precisión y exactitud del método [PPI_m][PF₆]-DLLME-HPLC-FD para agua Milli-Q.

| Analito | Conc. añadida (µg/L) | Conc. encontrada (µg/L) ^{a)} | Exactitud (%) | <i>t</i> ^{b)} |
|-----------------------|----------------------|---------------------------------------|---------------|------------------------|
| 2-Aminobenzimidazol | 45,0 | 42,8 ± 10,0 | 95 | 0,24 |
| | 375 | 374 ± 10 | 100 | 0,04 |
| Carbendazima/Benomilo | 30,0 | 32,0 ± 17,1 | 106 | 0,80 |
| | 245 | 244 ± 17 | 99 | 0,03 |
| Tiabendazol | 3,00 | 3,34 ± 1,24 | 111 | 2,40 |
| | 25,0 | 25,2 ± 1,1 | 101 | 0,08 |
| Fuberidazol | 0,045 | 0,045 ± 0,017 | 99 | 0,37 |
| | 0,375 | 0,379 ± 0,015 | 101 | 0,50 |
| Carbaril | 3,00 | 3,46 ± 0,60 | 115 | 1,10 |
| | 25,0 | 26,0 ± 0,5 | 104 | 0,38 |
| 1-Naftol | 3,00 | 3,13 ± 2,04 | 104 | 0,30 |
| | 25,0 | 27,4 ± 2,6 | 110 | 0,39 |
| Triazofos | 3,00 | 3,21 ± 0,78 | 107 | 2,41 |
| | 25,0 | 26,9 ± 0,7 | 107 | 1,56 |

a) Media ± intervalo de confianza de cinco extracciones ($m = 5$). b) $t_{\text{tab}} = 2,78$, $m - 1 = 4$, $\alpha = 0,05$.

La Figura IV.5.12 muestra los cromatogramas obtenidos tras someter una muestra de suelo de jardín (A) enriquecida y (B) sin enriquecer al procedimiento UAE-[PPIIm][PF₆]-HPLC-FD.

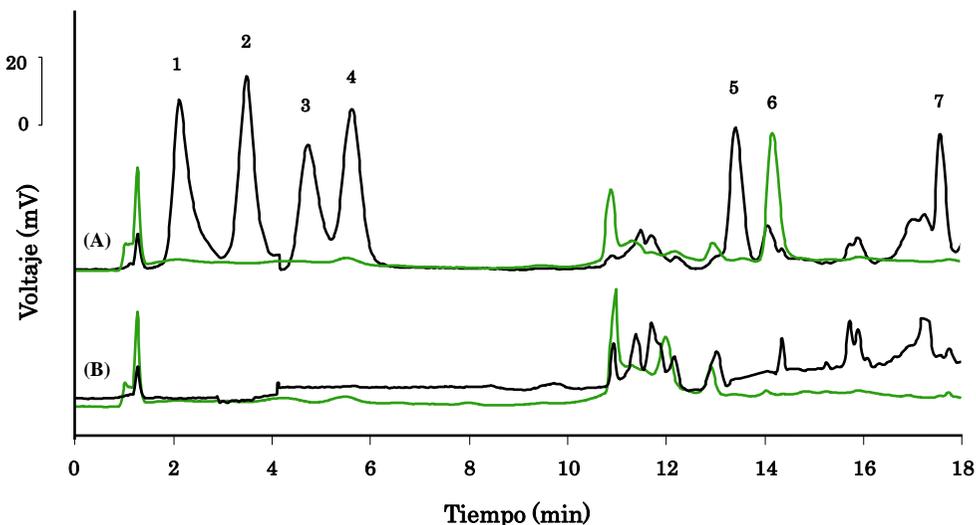


Figura IV.5.12.- Cromatograma HPLC-FD tras el procedimiento UAE-[PPIIm][PF₆]-DLLME de una muestra de suelo de jardín (A) enriquecida y (B) sin enriquecer. Muestra disuelta en: 72:28 (v/v) ACN/10 mM fosfato a pH 8,70. Concentración: 2-aminobenzimidazol (3200 ng/g), carbendazima/benomilo (1800 ng/g), tiabendazol (400 ng/g), fuberidazol (3,20 ng/g), carbaril (100 ng/g), 1-naftol (600 ng/g), triazofos (400 ng/g). (1) 2-aminobenzimidazol, (2) carbendazima/benomilo, (3) tiabendazol, (4) fuberidazol, (5) carbaril, (6) 1-naftol y (7) triazofos.

Como se puede observar en los cromatogramas, no se detectó la presencia de interferencias cromatográficas que impidieran la correcta identificación y cuantificación de los analitos de interés. Los cromatogramas obtenidos para el suelo forestal fueron similares.

A continuación se llevó a cabo un estudio de precisión y exactitud enriqueciendo ambos tipos de suelo a dos niveles de concentración diferentes y realizando la extracción por quintuplicado ($m = 5$). La Tabla IV.5.11 muestra los resultados de este estudio, obteniendo valores de t experimental iguales o menores que la t tabulada, así como una concordancia entre la concentración añadida y la encontrada entre el 93 y 118%.

Tabla IV.5.10.- Datos de calibración del procedimiento UAE-[PPI_m][PF₆]-DLLME-HPLC-FD para los dos tipos de suelo.

| Plaguicida | Suelo | Rango lineal (ng/g) | $b \pm t S_b$ | $a \pm t S_a$ | R ² | LOD ^{a)} (ng/g) |
|-----------------------|----------|------------------------|---|---|----------------|-----------------------------|
| 2-Aminobenzimidazol | Forestal | 200-12000 | $0,256 \times 10^4 \pm 0,005 \times 10^4$ | $4,53 \times 10^4 \pm 30,20 \times 10^4$ | 0,999 | 60,5 |
| | Jardín | 80-4500 | $0,517 \times 10^4 \pm 0,018 \times 10^4$ | $2,71 \times 10^4 \pm 37,01 \times 10^4$ | 0,999 | 23,3 |
| Carbendazima/benomilo | Forestal | 60-3500 | $0,736 \times 10^4 \pm 0,028 \times 10^4$ | $-43,9 \times 10^4 \pm 51,2 \times 10^4$ | 0,999 | 15,2 |
| | Jardín | 45-1800 | $0,791 \times 10^4 \pm 0,040 \times 10^4$ | $4,52 \times 10^4 \pm 32,90 \times 10^4$ | 0,998 | 12,9 |
| Tiabendazol | Forestal | 9-550 | $7,67 \times 10^4 \pm 0,25 \times 10^4$ | $-61,4 \times 10^4 \pm 59,7 \times 10^4$ | 0,999 | 2,50 |
| | Jardín | 10-600 | $5,16 \times 10^4 \pm 0,29 \times 10^4$ | $59,4 \times 10^4 \pm 74,2 \times 10^4$ | 0,998 | 2,73 |
| Fuberidazol | Forestal | 0,08-4,8 | $77,6 \times 10^5 \pm 2,9 \times 10^5$ | $-45,6 \times 10^4 \pm 70,2 \times 10^4$ | 0,999 | 0,020 |
| | Jardín | 0,08-3,2 | $57,3 \times 10^5 \pm 3,1 \times 10^5$ | $42,6 \times 10^4 \pm 44,7 \times 10^4$ | 0,998 | 0,020 |
| Carbaril | Forestal | 2-120 | $15,1 \times 10^4 \pm 0,3 \times 10^4$ | $10,7 \times 10^4 \pm 19,5 \times 10^4$ | 0,999 | 0,510 |
| | Jardín | 2,5-150 | $10,5 \times 10^4 \pm 0,6 \times 10^4$ | $-0,371 \times 10^4 \pm 42,801 \times 10^4$ | 0,998 | 0,741 |
| 1-Naftol | Forestal | 5-100 | $4,30 \times 10^4 \pm 0,31 \times 10^4$ | $2,22 \times 10^4 \pm 17,50 \times 10^4$ | 0,997 | 1,36 |
| | Jardín | 15-900 | $1,46 \times 10^4 \pm 0,02 \times 10^4$ | $12,4 \times 10^4 \pm 7,1 \times 10^4$ | 0,999 | 3,61 |
| Triazofos | Forestal | 6-360 | $2,50 \times 10^4 \pm 0,15 \times 10^4$ | $-11,1 \times 10^4 \pm 26,8 \times 10^4$ | 0,998 | 1,67 |
| | Jardín | 10-600 | $1,41 \times 10^4 \pm 0,07 \times 10^4$ | $-17,0 \times 10^4 \pm 21,1 \times 10^4$ | 0,999 | 2,52 |

a) Calculado como la concentración capaz de proporcionar una relación S/N de 3. b) pendiente. S_b: desviación estándar de la pendiente. a: ordenada en el origen. S_a: desviación estándar de la ordenada en el origen. R²: coeficiente de determinación ($n = 6$).

Tabla IV.5.11.- Estudio de precisión y exactitud del método UAE-[HMI_m][PF₆]-DLLME-HPLC-FD para los cuatro tipos de suelo.

| Plaguicida | Suelo | Conc. añadida (ng/g) | Conc. encontrada (ng/g) ^{a)} | Exactitud (%) | t ^{b)} |
|-----------------------|----------|----------------------|---------------------------------------|---------------|-----------------|
| 2-Aminobenzimidazol | Forestal | 505 | 474 ± 119 | 94 | 1,47 |
| | | 3232 | 3116 ± 103 | 96 | 1,04 |
| | Jardín | 200 | 191 ± 74 | 96 | 2,37 |
| | | 1180 | 1241 ± 66 | 97 | 0,45 |
| Carbendazima/benomilo | Forestal | 145 | 150 ± 70 | 103 | 2,70 |
| | | 928 | 901 ± 61 | 97 | 1,17 |
| | Jardín | 113 | 106 ± 42 | 95 | 1,13 |
| | | 720 | 747 ± 38 | 104 | 0,53 |
| Tiabendazol | Forestal | 22,5 | 23,1 ± 8,1 | 103 | 0,77 |
| | | 144 | 140 ± 7 | 97 | 0,39 |
| | Jardín | 25,0 | 25,0 ± 15,5 | 100 | 0,02 |
| | | 160 | 173 ± 14 | 108 | 0,73 |
| Fuberidazol | Forestal | 0,200 | 0,194 ± 0,092 | 97 | 0,17 |
| | | 1,28 | 1,23 ± 0,08 | 96 | 1,40 |
| | Jardín | 0,200 | 0,207 ± 0,079 | 104 | 0,54 |
| | | 1,28 | 1,34 ± 0,07 | 104 | 0,47 |

| | | | | | |
|-----------|----------|------|-------------|-----|------|
| Carbaril | Forestal | 5,00 | 5,34 ± 1,30 | 107 | 1,54 |
| | | 32,0 | 29,6 ± 1,1 | 93 | 2,25 |
| | Jardín | 6,25 | 6,68 ± 4,10 | 107 | 0,62 |
| | | 40,0 | 38,0 ± 3,7 | 95 | 0,52 |
| 1-Naftol | Forestal | 12,5 | 13,6 ± 3,5 | 109 | 1,08 |
| | | 80,0 | 84,8 ± 3,9 | 106 | 0,69 |
| | Jardín | 37,5 | 40,2 ± 5,0 | 107 | 0,55 |
| | | 240 | 228 ± 4 | 95 | 0,60 |
| Triazofos | Forestal | 15,0 | 14,8 ± 11,0 | 98 | 0,32 |
| | | 96,0 | 97,1 ± 10 | 101 | 0,26 |
| | Jardín | 25,0 | 29,6 ± 15,2 | 118 | 2,44 |
| | | 160 | 159 ± 14 | 99 | 0,04 |

a) Media ± intervalo de confianza de cinco extracciones ($m = 5$). b) $t_{tab} = 2,78$, $m - 1 = 4$, $\alpha = 0,05$.

IV.5.5.- COMPARACIÓN ENTRE [HMI_m][PF₆] Y [PPI_m][PF₆] COMO DISOLVENTES DE EXTRACCIÓN EN DLLME

De la comparación de los LODs obtenidos con ambos ILs, se puede apreciar que son del mismo orden de magnitud para los dos tipos de suelo seleccionados, tal como se puede apreciar en la Tabla IV.5.12. Además, fueron comparables para todos los analitos, excepto para el 2-aminobenzimidazol, para el que el LOD fue ligeramente más alto con el [PPI_m][PF₆] (60,5 ng/g vs. 14,2 ng/g para el suelo forestal y 23,3 ng/g vs. 15,5 ng/g para el suelo de jardín); y para el triazofos, el único plaguicida OPP estudiado, para el que los LODs fueron menores con el [PPI_m][PF₆] que con el [HMI_m][PF₆] (1,67 ng/g vs. 10,4 ng/g para el suelo forestal; 2,52 ng/g vs. 9,20 ng/g para el suelo de jardín).

Tabla IV.5.12.- Comparación de los LODs obtenidos empleando los dos ILs estudiados en este trabajo en los suelos seleccionados.

| Analito | LODs en el suelo forestal (ng/g) ^{a)} | | LODs en el suelo de jardín (ng/g) ^{a)} | |
|-----------------------|--|---------------------------------------|---|---------------------------------------|
| | [HMI _m][PF ₆] | [PPI _m][PF ₆] | [HMI _m][PF ₆] | [PPI _m][PF ₆] |
| 2-Aminobenzimidazol | 14,2 | 60,5 | 15,5 | 23,3 |
| Carbendazima/benomilo | 14,2 | 15,2 | 13,9 | 12,9 |
| Tiabendazol | 1,21 | 2,50 | 2,05 | 2,73 |
| Fuberidazol | 0,020 | 0,020 | 0,020 | 0,020 |
| Carbaril | 0,641 | 0,510 | 0,630 | 0,741 |
| 1-Naftol | 1,12 | 1,36 | 4,00 | 3,61 |
| Triazofos | 10,4 | 1,67 | 9,20 | 2,52 |

a) Calculado como la concentración capaz de proporcionar una relación S/N de 3.

En este sentido, hay que tener en cuenta, como ya se ha indicado, que debido a problemas de tipo operativo con el [PPI_m][PF₆], las condiciones de DLLME en el caso del [PPI_m][PF₆] difieren ligeramente (sólo en lo que al porcentaje de NaCl se refiere que es de un 5% (p/v) menos) a las utilizadas con el [HMI_m][PF₆]. Posiblemente, una optimización completa del procedimiento IL-DLLME utilizando el [PPI_m][PF₆], podría mejorar los LODs, aunque seguramente se obtendrían condiciones experimentales muy parecidas dada la similitud de ambos ILs.

IV.5.6.- CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en esta sección, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- Se desarrolló un método basado en el uso de la IL-DLLME y la HPLC con detección fluorescente para la extracción y determinación de un grupo de plaguicidas y algunos metabolitos, todos ellos con fluorescencia nativa, de extractos acuosos de suelo utilizando el [HMIm][PF₆] como disolvente de extracción. Las condiciones experimentales fueron optimizadas mediante un diseño experimental del tipo CCD y fue necesario realizar una extracción previa de los suelos asistida por ultrasonidos.
- Las mejores condiciones de UAE consistieron en realizar una extracción por duplicado de 3 g de suelo con 20 mL de MeOH que contenían un 2,5% (p/v) de NaCl. Las condiciones optimizadas del procedimiento IL-DLLME fueron las siguientes: 10 mL de extracto acuoso de suelo a pH 5,20 conteniendo un 30% (p/v) de NaCl, 117,5 mg de IL y 418 µL de MeOH.
- La validación del método UAE-[HMIm][PF₆]-DLLME-HPLC-FD se llevó a cabo realizando un calibrado de método y un estudio de precisión y exactitud en agua Milli-Q y en cuatro suelos con propiedades fisicoquímicas diferentes. El método resultó ser sencillo, efectivo y repetible, obteniendo LODs en el rango de los ng/g para los suelos y de los µg/L para el agua. Además, se trata de la primera vez que se utiliza la IL-DLLME para la extracción de analitos orgánicos de extractos de suelo.
- Se llevó a cabo la síntesis, purificación y caracterización de un segundo IL, el [PPIIm][PF₆]. La aplicación directa de las condiciones experimentales previamente optimizadas para la DLLME con el IL [HMIm][PF₆] de los mismos analitos en los suelos no fue posible, debido a una inversión de las fases, siendo necesaria una disminución del 5% (p/v) del porcentaje de NaCl.
- El método UAE-[PPIIm][PF₆]-DLLME-HPLC-FD también se validó mediante la obtención del correspondiente calibrado de método, y un estudio de precisión y exactitud en agua Milli-Q y en dos de los suelos ensayados anteriormente. Se trata de la primera vez que este IL es utilizado en DLLME.

- Se realizó una comparación de la capacidad de extracción de ambos ILs, confrontando los LODs obtenidos para los dos métodos y para los dos suelos que se estudiaron en común (forestal y de jardín). Los resultados indicaron que la capacidad de extracción era comparable para todos los analitos, excepto para 2-aminobenzimidazol, para el que el LOD fue ligeramente menor con el [HMIIm][PF₆], y para triazofos, para el que el LOD fue ligeramente menor con el [PPIIm][PF₆].
- De acuerdo con los buenos resultados obtenidos en el presente estudio, se propone la utilización del [PPIIm][PF₆] para la extracción mediante DLLME de diferentes familias de plaguicidas a las estudiadas en este trabajo, sus metabolitos, o incluso otros tipos de compuestos. Además, sería interesante estudiar su capacidad de extracción para otras matrices y en otras técnicas de LPME.

IV.6.- MICROEXTRACCIÓN EN FASE LÍQUIDA CON FIBRA HUECA PARA LA DETERMINACIÓN DE PLAGUICIDAS Y METABOLITOS EN SUELOS Y AGUAS UTILIZANDO CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN Y DETECCIÓN POR FLUORESCENCIA

En esta sección se ha desarrollado un método sencillo y rápido para la determinación del mismo grupo de analitos de la sección IV.5 (2-aminobenzimidazol, carbendazima/benomilo, tiabendazol, fuberidazol, carbaril, 1-naftol y triazofos) en tres tipos de aguas (Milli-Q, mineral y de escorrentía) y dos tipos de suelo (forestal y lapilli), realizando la extracción mediante un procedimiento de HF-LPME en dos fases, utilizando 1-octanol como disolvente de extracción. En el caso de los suelos fue necesario realizar una extracción previa asistida por ultrasonidos. Los parámetros que afectan a la eficacia de la extracción en la HF-LPME (disolvente orgánico, pH de la muestra, tiempo de extracción, velocidad de agitación, temperatura y fuerza iónica) fueron optimizados paso a paso. La separación y cuantificación se realizó mediante HPLC-FD, permitiendo alcanzar LODs del orden de ng/g para los suelos y del orden de µg/L para las aguas, por debajo de los LMRs establecidos por la UE para casi todos los analitos. Este trabajo constituye la primera aplicación en la que estos analitos, a excepción del triazofos, son extraídos de extractos de suelo mediante HF-LPME. Además, tanto 2-aminobenzimidazol, como fuberidazol y 1-naftol no habían sido extraídos por HF-LPME en ningún caso. Asimismo, hasta el momento, y sorprendentemente, no existían aplicaciones de la HF-LPME de suelos combinada con HPLC, ni se había utilizado el 1-octanol como disolvente de extracción con este tipo de matriz.

IV.6.1.- ANTECEDENTES

Como se ha demostrado en secciones anteriores, el desarrollo de metodologías robustas para la determinación de plaguicidas y sus productos de degradación en muestras medioambientales es ciertamente importante. En este sentido, el tratamiento de la muestra es la etapa crítica y debe ser altamente selectiva, especialmente en el caso de los suelos.

En la última década, y especialmente durante los últimos cinco años, la HF-LPME ha sido ampliamente utilizada para la extracción de diferentes grupos de analitos de una amplia variedad de matrices, sobre todo de aguas de diferente

naturaleza (PINTO Y COLS., 2010). Sin embargo, en lo que respecta al análisis de suelos, las aplicaciones desarrolladas hasta el momento de la realización de la presente Tesis Doctoral eran muy escasas, considerando la fecha en la que se introdujo esta técnica. En este sentido, la HF-LPME se había utilizado para la extracción de PAHs en dos ocasiones (KING Y COLS., 2002; JIANG Y COLS., 2005), así como de polibromodifenil éteres (XIAO Y COLS., 2007), bifenilos policlorados (BASHEER Y COLS., 2005) y clorofenoles (CHUNG Y LEE, 2008). En cuanto al análisis de plaguicidas en esta misma matriz, se habían determinado doce OCPs (BASHEER Y COLS., 2005), ocho plaguicidas de diferentes familias (HOU Y LEE, 2004), seis OSPs (XIONG Y HU, 2008), siete plaguicidas de diferentes familias (HOU Y COLS., 2003) y vinclozín (LAMBROPOULOU Y ALBANIS, 2004). En todos los casos la extracción se llevó a cabo en el modo de dos fases. En dos de estos trabajos, se utilizaron suspensiones acuosas (HOU Y COLS., 2003) y acuo-orgánicas (HOU Y LEE, 2004) de los suelos para llevar a cabo la HF-LPME, un modo operacional incapaz de proporcionar LODs suficientemente bajos. En el resto, se realizó una extracción previa de los analitos. Éste es el caso de la utilización de MASE (BASHEER Y COLS., 2005) y UAE (XIONG Y HU, 2008) con agua que posteriormente sería utilizada como fase aceptora, o UAE con una mezcla de MeOH/ACN seguida de una evaporación y reconstitución en agua del extracto seco final (LAMBROPOULOU Y ALBANIS, 2004). En cuatro de estos cinco trabajos se utilizó el tolueno como disolvente aceptor, empleando fibras de PP de 1,3 cm (HOU Y COLS., 2003; HOU Y LEE, 2004; LAMBROPOULOU Y ALBANIS, 2004; BASHEER Y COLS., 2005), mientras que sólo en un caso se empleó σ -xileno con una fibra de 1,0 cm (XIONG Y HU, 2008). En todos estos trabajos, desarrollados para plaguicidas volátiles, se ha empleado la GC como técnica de separación. Además, en ninguno de ellos se habían determinado simultáneamente plaguicidas y metabolitos.

IV.6.2.- OPTIMIZACIÓN DEL PROCEDIMIENTO DE HF-LPME

Antes de realizar la optimización de los parámetros que afectan directamente a la extracción, se efectuaron diversos experimentos con el objetivo de establecer algunos aspectos prácticos importantes cuando se lleva a cabo un procedimiento de HF-LPME.

En un buen número de trabajos (ZHU Y COLS., 2002; LAMBROPOULOU Y ALBANIS, 2004; HUANG Y HUANG, 2006; BEDENDO Y CARASEK, 2010) se insiste en el hecho de que,

antes de su utilización, la fibra hueca se debe someter a un lavado con acetona para eliminar impurezas provenientes del propio proceso de producción, y que podían interferir posteriormente en la determinación cromatográfica. Para la presente aplicación se comprobó que dicho lavado no era necesario, ya que no se observó ninguna interferencia en los cromatogramas y, por tanto, la fibra se utilizó tal como se recibió. Es importante resaltar que este lavado con acetona tampoco se describe en otras aplicaciones (PLAZA BOLAÑOS Y COLS., 2008; BARAHONA Y COLS., 2010).

Por otra parte, se llevaron a cabo algunos experimentos encaminados a establecer el modo de impregnar la fibra con el disolvente de extracción. En la mayoría de las aplicaciones, la fibra se sumerge en el disolvente y se somete a ultrasonidos (LAMBROPOULOU Y ALBANIS, 2007; PEDERSEN-BJERGAARD Y RASMUSSEN, 2008). Posteriormente, el exceso de disolvente es eliminado con agua. Sin embargo, este modo de proceder puede dar lugar a una cierta irreproducibilidad de los resultados. En este trabajo, se optó por rellenar una jeringa de inyección para HPLC de 25 μL con una cantidad suficiente de disolvente orgánico (20 μL). La fibra se impregnó lentamente desde el interior con el disolvente, observando que gradualmente se humedecía formando la SLM. Dado que se trabajó en el modo en dos fases, el disolvente se continuó introduciendo en el interior de la fibra hasta que ésta quedara completamente llena y no se observaran burbujas en el interior.

Con respecto al sellado del extremo de la fibra, a pesar de que en la bibliografía se describe el sellado mediante calor (MIRZAEI Y DINPANAH, 2011) o incluso, utilizando la aguja de una segunda jeringa (BEDENDO Y COLS., 2010), en general, cuando se trabaja en HF(2)-LPME, no es necesario el sellado debido a la inmiscibilidad del disolvente con la muestra acuosa. Por tanto, se trabajó con fibras sin sellar, sin observar problemas de reproducibilidad entre ellas.

A continuación, se estudiaron paso a paso los diferentes parámetros que pueden afectar a la eficacia de extracción. Todos los experimentos se llevaron a cabo por duplicado utilizando 10 mL de agua Milli-Q enriquecida a una concentración de aproximadamente 1 $\mu\text{g/L}$ de todos los analitos, excepto para fuberidazol (5 ng/L) y carbendazima/benomilo (5 $\mu\text{g/L}$).

IV.6.2.1.- SELECCIÓN DEL DISOLVENTE DE EXTRACCIÓN

En base a las fasesceptoras más utilizadas en artículos previos de HF(2)-LPME, se ensayaron distintos disolventes orgánicos, como 1-octanol, dihexiléter, tolueno y acetato de etilo (PEDERSEN-BJERGAARD Y RASMUSSEN, 2008). Para ello, se tomaron 10 mL de agua Milli-Q enriquecidos con los analitos de interés. Inicialmente, el pH se mantuvo a un valor de 8,0, porque a dicho pH los analitos se encuentran en su forma neutra y, por tanto, pueden migrar a través de las paredes hidrofóbicas de la membrana (ver valores de pK_a en la Tabla IV.5.1). En todos los casos la fibra utilizada fue de 2,0 cm de longitud y las extracciones se realizaron a 800 rpm durante 30 min.

Cuando se utilizó acetato de etilo, se observó que se debía prestar especial atención durante la etapa de impregnación de la fibra, ya que el disolvente se evaporaba muy rápidamente. A pesar de ello, ninguno de los analitos se recuperaba bajo las condiciones seleccionadas. Al emplear dihexiléter, fue posible extraer, aunque en pequeña cantidad, sólo carbaril, 1-naftol y triazofos, mientras que con tolueno, se extrajo además el tiabendazol. Sin embargo, al utilizar 1-octanol, se extrajeron todos los analitos, excepto el 2-aminobenzimidazol, cuyo $\log K_{ow}$ es el más bajo de todos los compuestos estudiados (0,91 vs. 1,48-3,55 a pH 7 y 20 °C (FOOTPRINT, IUPAC)). Por ello, se seleccionó el 1-octanol como disolvente de extracción.

IV.6.2.2.- SELECCIÓN DEL pH DE LA FASE ACUOSA

Bajo las mismas condiciones previamente descritas (fibra de 2,0 cm impregnada en 1-octanol y agitación a 800 rpm durante 30 min), el pH de la muestra acuosa se varió entre 6,0 y 10,0. Como se puede observar en la Figura IV.6.1, para carbendazima/benomilo, tiabendazol, fuberidazol y triazofos, la eficacia de la extracción se vio ampliamente favorecida con el aumento del pH. Sin embargo, para carbaril y 1-naftol ésta experimentó una importante disminución a altos valores de pH, un hecho justificable por los valores de pK_a de estos dos compuestos, 10,4 para el carbaril y 9,34 para el 1-naftol (FOOTPRINT, IUPAC). En los alrededores de estos valores de pH y, sobre todo por encima, están parcial o totalmente cargados negativamente y, por tanto, no pueden atravesar de manera eficaz la SLM hidrofóbica.

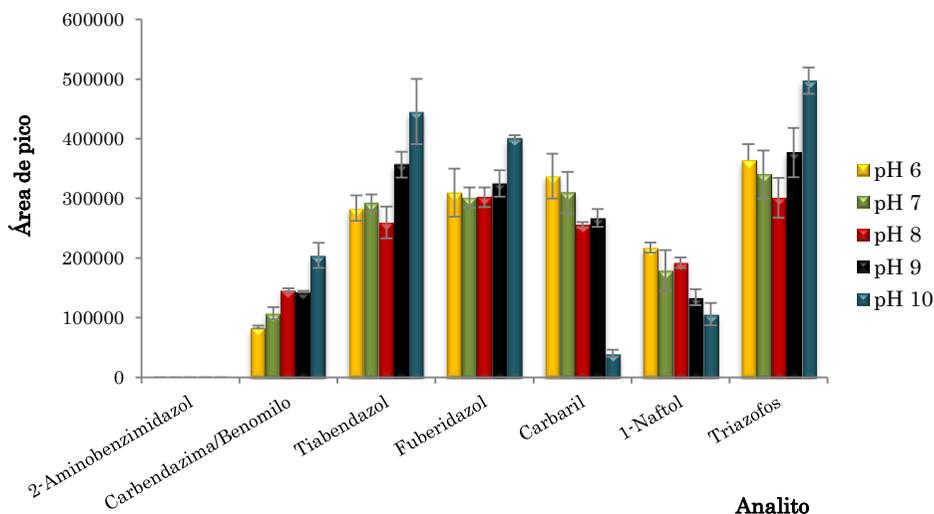


Figura IV.6.1.- Efecto de la variación del pH de la fase acuosa/dadora en la eficacia de la extracción ($n = 2$). Las barras de error representan la desviación estándar. Concentración: 1 $\mu\text{g/L}$, excepto fuberidazol (5 ng/L) y carbendazima/benomilo (5 $\mu\text{g/L}$). Condiciones de extracción: 10 mL de agua Milli-Q, 0% (p/v) NaCl, 2,0 cm de fibra, 1-octanol como disolvente de extracción y agitación a 800 rpm durante 30 min a 25 °C.

Por esta razón, se seleccionó un pH de 9,0 para continuar la optimización. Es importante destacar que el 2-aminobenzimidazol no se extraía bajo estas condiciones a ningún valor de pH.

IV.6.2.3.- INFLUENCIA DE LA FUERZA IÓNICA DE LA FASE ACUOSA

La adición de NaCl a la fase acuosa cuando se lleva a cabo un procedimiento de LPME es una práctica común que, en muchos casos, mejora considerablemente la extracción. En este trabajo, el porcentaje de NaCl se varió entre 0 y 30% (p/v). Como se puede observar en la Figura IV.6.2, la extracción fue máxima para la mayoría de los plaguicidas cuando se utilizó un 20% (p/v) de NaCl. Además, a partir de ese valor el 2-aminobenzimidazol también se pudo extraer, lo que pone de manifiesto la existencia de un efecto de *salting-out* importante sobre todo para este compuesto. Cuando se aumentó la concentración de NaCl por encima de ese valor, las áreas de pico disminuyeron, lo que coincidía con lo descrito en la bibliografía respecto al uso de elevadas concentraciones de sal (LAMBROPOULOU Y ALBANIS, 2007). Dejando de lado el efecto de *salting-out*, que es diferente para cada analito, la adición de cantidades altas de NaCl puede

originar cambios en las propiedades fisicoquímicas de la fibra, reduciendo las velocidades de difusión de los analitos hacia el disolvente orgánico. Además, puede favorecer la formación de burbujas en la superficie de la membrana, provocando problemas de repetibilidad. Por tanto, se seleccionó un 20% (p/v) de NaCl.

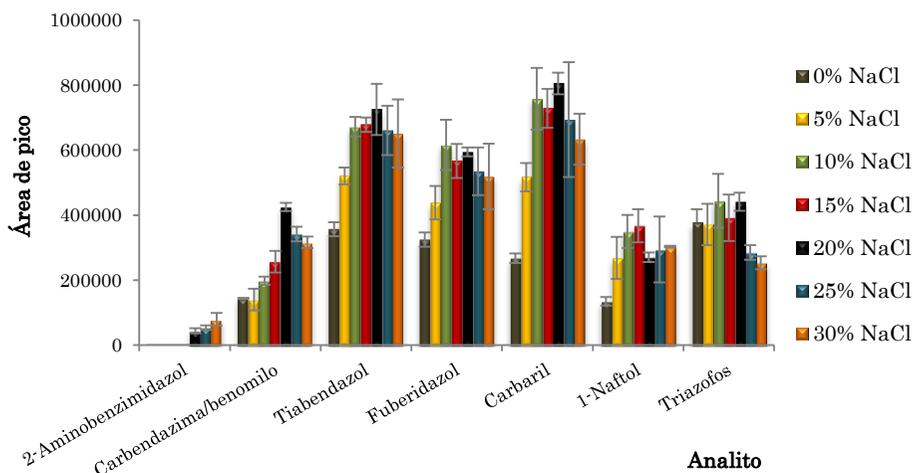


Figura IV.6.2.- Efecto de la variación de la fuerza iónica (% p/v) de la fase acuosa/dadora en la eficacia de la extracción ($n = 2$). Las barras de error representan la desviación estándar. Concentración: 1 $\mu\text{g/L}$, excepto fuberidazol (5 ng/L) y carbendazima/benomilo (5 $\mu\text{g/L}$). Condiciones de extracción: 10 mL de agua Milli-Q, pH 9,0, 2,0 cm de fibra, 1-octanol como disolvente de extracción y agitación a 800 rpm durante 30 min a 25 °C.

IV.6.2.4.- INFLUENCIA DE LA VELOCIDAD DE AGITACIÓN

La agitación es un factor importante en LPME. Por un lado, gobierna la transferencia de masa hacia el disolvente de extracción y, por otro, también contribuye a alcanzar el equilibrio termodinámico, disminuyendo el tiempo de extracción. Por ello, se llevaron a cabo experimentos a diferentes velocidades de agitación, entre 400 y 1600 rpm (Figura IV.6.3). Como era de esperar, la eficacia de la extracción aumentó con el incremento de la velocidad de agitación para básicamente todos los analitos, hasta 1440 rpm. Velocidades superiores provocaron una disminución de la extracción debido a la dificultad que supone para los mismos penetrar en la membrana en estas condiciones.

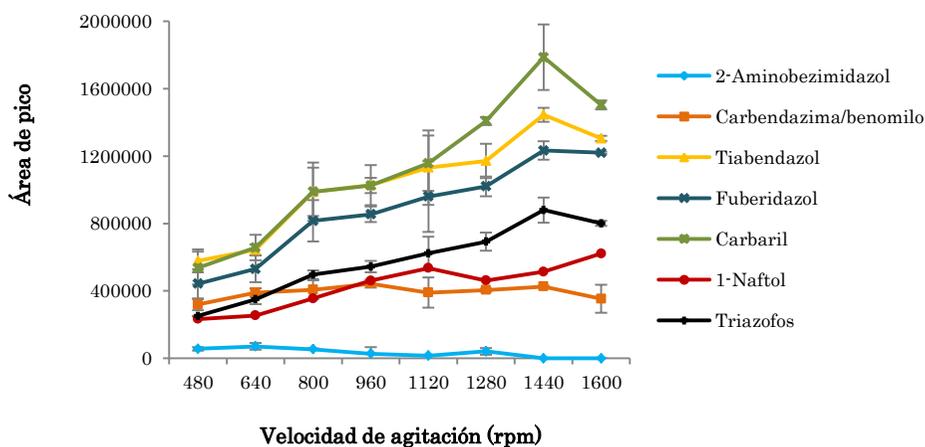


Figura IV.6.3.- Efecto de la variación de la velocidad de agitación (rpm) en la eficacia de la extracción ($n = 2$). Las barras de error representan la desviación estándar. Concentración: 1 $\mu\text{g/L}$, excepto fuberidazol (5 ng/L) y carbendazima/benomilo (5 $\mu\text{g/L}$). Condiciones de extracción: 10 mL de agua Milli-Q, 20% (p/v) de NaCl, pH 9,0, 2,0 cm de fibra, 1-octanol como disolvente de extracción y 30 min a 25 °C.

Además, a velocidades altas, no se pudo obtener una agitación homogénea y continua, lo que, con total seguridad, repercutiría en la repetibilidad del método. Por ello, se seleccionó una agitación de 1440 rpm.

IV.6.2.5.- INFLUENCIA DEL TIEMPO DE EXTRACCIÓN

Es ampliamente conocido que la transferencia de masa es un proceso que depende del tiempo, hasta que se alcanza el equilibrio de extracción. De ahí que se realizaran diversos experimentos incrementando el tiempo de exposición de la fibra bajo las mejores condiciones obtenidas hasta el momento (Figura IV.6.4). Como era de esperar, se obtuvo un perfil de extracción típico, no alcanzándose el equilibrio para la mayoría de los plaguicidas ni siquiera tras 120 min. Sin embargo, en LPME, es conveniente seleccionar un tiempo de extracción que proporcione una buena sensibilidad y precisión sin prolongar innecesariamente el tiempo de análisis. En base a esto, se decidió seleccionar 30 min, además porque el 2-aminobenzimidazol a tiempos mayores no se conseguía extraer en absoluto.

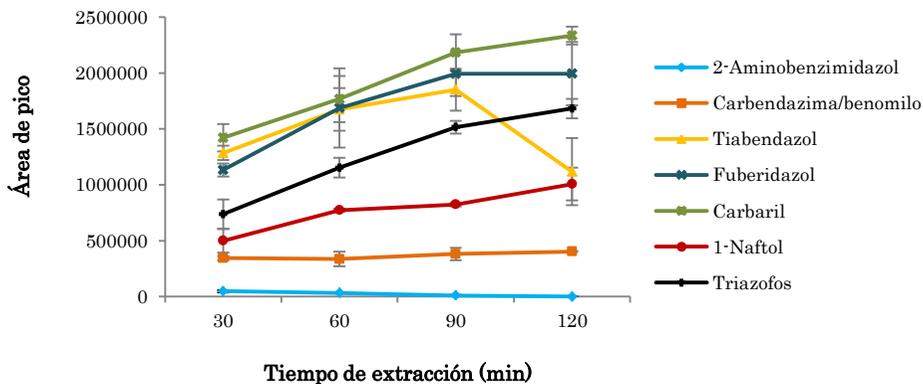


Figura IV.6.4.- Efecto de la variación del tiempo de extracción en la eficacia de la extracción ($n = 2$). Las barras de error representan la desviación estándar. Concentración: 1 $\mu\text{g/L}$, excepto fuberidazol (5 ng/L) y carbendazima/benomilo (5 $\mu\text{g/L}$). Condiciones de extracción: 10 mL de agua Milli-Q, 20% (p/v) de NaCl, pH 9,0, 2,0 cm de fibra, 1-octanol como disolvente de extracción, agitación a 1440 rpm y 25 $^{\circ}\text{C}$.

Es importante destacar, además, que en la mayoría de los trabajos descritos en la bibliografía sobre el análisis de plaguicidas mediante HF-LPME, el tiempo de extracción casi nunca ha sobrepasado los 60 min y, generalmente, se suelen tomar tiempos más cortos, entre 15 y 30 min (LAMBROPOULOU Y ALBANIS, 2007).

IV.6.2.6.- INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA DE EXTRACCIÓN

Cuando se aumenta la temperatura, la velocidad de transferencia de masa de un analito se ve incrementada. Sin embargo, dicho aumento también provoca una disminución de los coeficientes de partición (K_{ow}) (LAMBROPOULOU Y ALBANIS, 2004). Por lo tanto, la eficacia de la extracción va a ser mayor o menor dependiendo del factor dominante en cada caso. Como se puede apreciar en la Figura IV.6.5, la temperatura se varió desde 25 $^{\circ}\text{C}$ (temperatura ambiente) a 65 $^{\circ}\text{C}$, observando un comportamiento no homogéneo para todo el grupo. Concretamente, tiabendazol, fuberidazol, 1-naftol y triazofos se vieron afectados positivamente por este efecto, mientras que para la carbendazima/benomilo, la eficacia de extracción se mantuvo constante en todo el rango de temperatura, no siendo así para el 2-aminobenzimidazol, que a temperaturas altas no se conseguía extraer. Además, se observó que para el carbaril la eficacia de la extracción disminuía con la temperatura, hasta el punto de que el área de pico obtenida a 65 $^{\circ}\text{C}$ se reducía notablemente, probablemente debido a que el efecto sobre el K_{ow} era más

apreciable.

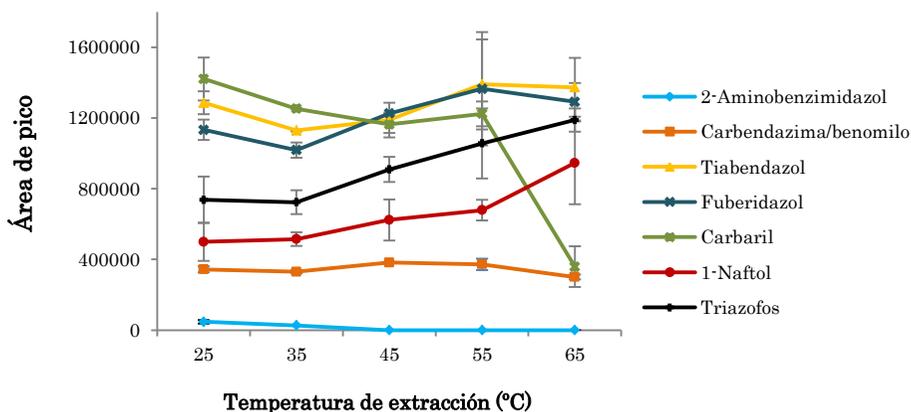


Figura IV.6.5.- Efecto de la temperatura de extracción en la eficacia de la extracción ($n = 2$). Las barras de error representan la desviación estándar. Concentración: 1 $\mu\text{g/L}$, excepto fuberidazol (5 ng/L) y carbendazima/benomilo (5 $\mu\text{g/L}$). Condiciones de extracción: 10 mL de agua Milli-Q, 20% (p/v) de NaCl, pH 9,0, 2,0 cm de fibra, 1-octanol como disolvente de extracción, agitación a 1440 rpm y 30 min.

Por todo ello, se seleccionó una temperatura de 25 °C para llevar a cabo la extracción. Por otra parte, cabe destacar que el uso de temperaturas más elevadas ha demostrado causar una disolución parcial del disolvente orgánico en la fase acuosa (LAMBROPOULOU Y ALBANIS, 2004) y, por tanto, una disminución importante de la eficacia extractiva.

IV.6.3.- UAE-HF-LPME -HPLC-FD DE MUESTRAS DE SUELO

Seguidamente, el procedimiento de HF-LPME previamente optimizado se aplicó a la extracción y preconcentración de los analitos de interés de extractos acuosos de diferentes suelos. En la sección IV.5, se habían optimizado las condiciones de extracción previa mediante UAE de este mismo grupo de analitos (sección IV.5.3.3.2), por lo que se decidió realizar la extracción utilizando el mismo procedimiento.

IV.6.3.1.- MUESTRAS DE SUELO SELECCIONADAS

En este caso se seleccionaron dos tipos de suelo, forestal y lapilli (ver Tabla IV.5.5), cuyas propiedades diferían notablemente, para validar la capacidad analítica del método propuesto.

IV.6.3.2.- VALIDACIÓN DEL MÉTODO UAE-HF-LPME-HPLC-FD

Del mismo modo que en la sección IV.5, se obtuvo el calibrado del método enriqueciendo muestras de cada suelo a seis niveles de concentración diferentes ($n = 6$). Los resultados, mostrados en la Tabla IV.6.1, evidencian que la respuesta del detector fue lineal en todo el rango estudiado con coeficientes de determinación (R^2) por encima de 0,996. Los LODs oscilaron entre 0,001 y 4,78 ng/g para el suelo forestal y entre 0,001 y 6,94 ng/g para el lapilli, para el fuberidazol y el 2-aminobenzimidazol, respectivamente. Estos valores, que fueron comprobados experimentalmente, son del mismo orden de magnitud (ng/g) que los obtenidos para el análisis de plaguicidas en suelos con otras técnicas de extracción y determinación (ANDREY Y PICÓ, 2004).

Como se indicó en los antecedentes, hasta el momento se habían publicado pocos trabajos que hubieran utilizado la HF-LPME para la extracción de plaguicidas de muestras de suelos. En este sentido, Hou y Lee (HOU Y LEE, 2004), empleando una HF-LPME dinámica para extraer ocho plaguicidas (la mayoría OCPs) de una suspensión de suelo, alcanzaron LODs que oscilaron entre 0,05 y 0,1 $\mu\text{g/g}$, valores muy superiores a los obtenidos en el presente trabajo. Por otra parte, Lambropoulou y Albanis (2004) y Basheer y cols. (2005) obtuvieron LODs de 0,5 ng/g para vinclozín y en el rango 0,05-0,1 ng/g para doce OCPs, respectivamente. Estos valores son comparables a los obtenidos en este trabajo para todos los analitos y, particularmente, son más altos que los obtenidos para el fuberidazol y menores que los obtenidos para el 2-aminobenzimidazol y la carbendazima/benomilo. Por otra parte, sólo el triazofos se había extraído previamente de muestras de suelos mediante HF-LPME (XIONG Y HU, 2008), pero en dicho trabajo sólo se indicaba el valor del LOD para muestras de agua, no siendo así para los suelos. Respecto a otros trabajos en los que se emplearon otros modos de LPME, Wu y cols. (2009a) determinaron carbendazima y triazofos mediante DLLME-HPLC-FD tras una UAE con agua acidulada, obteniendo LODs entre 1,0 y 1,6 ng/g (también similares a los obtenidos). Por otra parte, es de destacar que también se mejoraron los LODs alcanzados mediante el procedimiento UAE-IL-DLLME descrito en la sección IV.5 de la presente Tesis Doctoral.

Tabla IV.6.1.- Datos de calibración del método UAE-HF-LPME-HPLC-FD para los dos tipos de suelo.

| Plaguicida | Suelo | Rango lineal (ng/g) | $b \pm t S_b$ | $a \pm t S_a$ | R ² | LOD ^{a)} (ng/g) |
|-----------------------|----------|------------------------|---|---|----------------|-----------------------------|
| 2-Aminobenzimidazol | Forestal | 16-1080 | $1,79 \times 10^4 \pm 0,01 \times 10^4$ | $-3,53 \times 10^4 \pm 6,01 \times 10^4$ | 0,999 | 4,78 |
| | Lapilli | 27-1080 | $1,74 \times 10^4 \pm 0,08 \times 10^4$ | $-6,86 \times 10^4 \pm 38,32 \times 10^4$ | 0,999 | 6,94 |
| Carbendazima/benomilo | Forestal | 8-380 | $2,53 \times 10^4 \pm 0,09 \times 10^4$ | $0,79 \times 10^4 \pm 15,41 \times 10^4$ | 0,999 | 2,39 |
| | Lapilli | 10-380 | $2,29 \times 10^4 \pm 0,03 \times 10^4$ | $-2,57 \times 10^4 \pm 5,66 \times 10^4$ | 0,999 | 4,00 |
| Tiabendazol | Forestal | 1,5-56 | $23,6 \times 10^4 \pm 0,9 \times 10^4$ | $-1,12 \times 10^4 \pm 23,33 \times 10^4$ | 0,999 | 0,40 |
| | Lapilli | 1,5-56 | $17,8 \times 10^4 \pm 0,3 \times 10^4$ | $15,1 \times 10^4 \pm 7,1 \times 10^4$ | 0,999 | 0,57 |
| Tiabendazol | Forestal | 0,005-0,2 | $76,4 \times 10^6 \pm 4,1 \times 10^6$ | $-11,2 \times 10^4 \pm 38,1 \times 10^4$ | 0,998 | 0,001 |
| | Lapilli | 0,005-0,2 | $62,9 \times 10^6 \pm 0,8 \times 10^6$ | $4,78 \times 10^4 \pm 7,18 \times 10^4$ | 0,999 | 0,001 |
| Carbaril | Forestal | 0,5-36 | $33,5 \times 10^4 \pm 0,7 \times 10^4$ | $29,3 \times 10^4 \pm 12,3 \times 10^4$ | 0,999 | 0,15 |
| | Lapilli | 0,9-36 | $26,5 \times 10^4 \pm 1,8 \times 10^4$ | $18,7 \times 10^4 \pm 27,4 \times 10^4$ | 0,997 | 0,22 |
| 1-Naftol | Forestal | 0,4-26 | $12,7 \times 10^4 \pm 0,2 \times 10^4$ | $-0,78 \times 10^4 \pm 2,05 \times 10^4$ | 0,999 | 0,10 |
| | Lapilli | 0,65-26 | $7,12 \times 10^4 \pm 0,58 \times 10^4$ | $-2,82 \times 10^4 \pm 6,05 \times 10^4$ | 0,995 | 0,12 |
| Triazofos | Forestal | 1,25-50 | $11,6 \times 10^4 \pm 0,2 \times 10^4$ | $2,39 \times 10^4 \pm 5,23 \times 10^4$ | 0,999 | 0,35 |
| | Lapilli | 1,25-25 | $12,0 \times 10^4 \pm 1,0 \times 10^4$ | $-0,941 \times 10^4 \pm 11,450 \times 10^4$ | 0,996 | 0,54 |

a) Calculado como la concentración capaz de proporcionar una relación S/N de 3. b: pendiente. S_b: desviación estándar de la pendiente. a: ordenada en el origen. S_a: desviación estándar de la ordenada en el origen. R²: coeficiente de determinación (n = 6).

La Figura IV.6.6 muestra los cromatogramas de una muestra de suelo forestal enriquecida (A) y no enriquecida (B), tras aplicar el método UAE-HF-LPME-HPLC-FD previamente optimizado. En ningún caso se apreciaron interferencias que impidieran la correcta determinación de los analitos. Para el lapilli se obtuvieron cromatogramas similares.

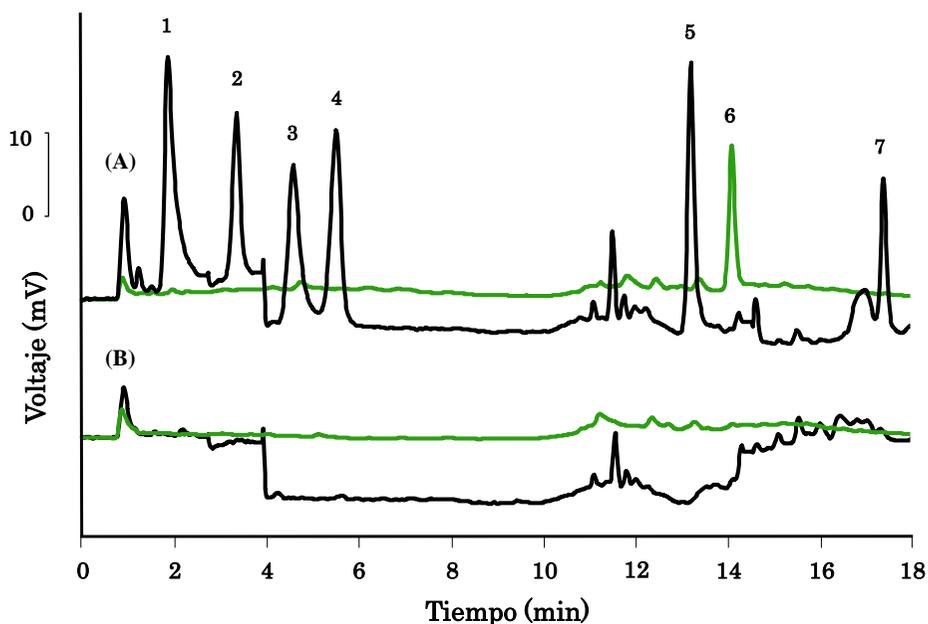


Figura IV.6.6.- Cromatograma HPLC-FD obtenido tras aplicar el procedimiento UAE-HF-LPME a una muestra de suelo forestal (A) enriquecida y (B) sin enriquecer. Concentración: 2-aminobenzimidazol (270 ng/g), carbendazima/benomilo (96,0 ng/g), tiabendazol (14,0 ng/g), fuberidazol (0,05 ng/g), carbaril (9,00 ng/g), 1-naftol (13,0 ng/g), triazofos (12,5 ng/g). Velocidad de flujo: 1 mL/min. Volumen de inyección: 20 μ L. Muestra disuelta en: 78:22 (v/v) ACN/10 mM de fosfato a pH 8,70. (1) 2-aminobenzimidazol, (2) carbendazima/benomilo, (3) tiabendazol, (4) fuberidazol, (5) carbaril, (6) 1-naftol y (7) triazofos.

Por último, se llevó a cabo un estudio de precisión y exactitud a dos niveles de concentración diferentes por quintuplicado para cada suelo ($m = 5$), realizando un test t de Student. La Tabla IV.6.2 muestra los resultados de este estudio, alcanzando en todos los casos valores de t inferiores al tabulado (2,78 para $m - 1 = 4$, $\alpha = 0,05$) y una concordancia entre la concentración añadida y la encontrada entre el 85-117% para el suelo forestal, y entre 86-115% para el lapilli, lo que demuestra la elevada repetibilidad del método.

Tabla IV.6.2.- Estudio de precisión y exactitud del método UAE-HF-LPME-HPLC-FD para los dos tipos de suelo.

| Plaguicida | Suelo | Conc. añadida (ng/g) | Conc. encontrada (ng/g) ^{a)} | Exactitud (%) | <i>f</i> ^{b)} |
|-----------------------|----------|----------------------|---------------------------------------|---------------|------------------------|
| 2-Aminobenzimidazol | Forestal | 33,8 | 35,9 ± 4,1 | 106 | 0,71 |
| | | 216 | 243 ± 4 | 112 | 2,77 |
| | Lapilli | 40,5 | 41,0 ± 22,7 | 101 | 0,11 |
| | | 216 | 211 ± 20 | 97 | 0,75 |
| Carbendazima/benomilo | Forestal | 12,0 | 11,3 ± 6,2 | 93 | 1,85 |
| | | 76,8 | 78,4 ± 5,7 | 102 | 0,42 |
| | Lapilli | 14,4 | 14,4 ± 2,2 | 100 | 0,02 |
| | | 76,8 | 85,7 ± 1,9 | 112 | 1,48 |
| Tiabendazol | Forestal | 1,75 | 1,85 ± 1,33 | 106 | 0,59 |
| | | 11,2 | 10,4 ± 1,2 | 93 | 0,64 |
| | Lapilli | 2,10 | 2,34 ± 0,43 | 112 | 1,40 |
| | | 11,2 | 11,9 ± 0,4 | 106 | 0,48 |
| Fuberidazol | Forestal | 0,006 | 0,007 ± 0,005 | 117 | 2,70 |
| | | 0,040 | 0,038 ± 0,005 | 96 | 1,08 |
| | Lapilli | 0,008 | 0,008 ± 0,001 | 106 | 0,65 |
| | | 0,040 | 0,043 ± 0,001 | 107 | 0,81 |

(Continúa en la página siguiente)

Tabla IV.6.2.- (Continuación)

| Plaguicida | Suelo | Conc. añadida (ng/g) | Conc. encontrada (ng/g) ^{a)} | Exactitud (%) | <i>t</i> ^{b)} |
|------------|----------|----------------------|---------------------------------------|---------------|------------------------|
| Carbaril | Forestal | 1,13 | 1,21 ± 0,38 | 107 | 0,41 |
| | | 7,20 | 7,91 ± 0,34 | 110 | 1,28 |
| | Lapilli | 1,35 | 1,33 ± 1,23 | 99 | 0,18 |
| | | 7,20 | 8,11 ± 1,18 | 113 | 1,81 |
| 1-Naftol | Forestal | 0,813 | 0,740 ± 0,173 | 91 | 1,27 |
| | | 5,20 | 4,41 ± 0,15 | 85 | 1,77 |
| | Lapilli | 0,975 | 1,121 ± 1,075 | 115 | 1,36 |
| | | 5,20 | 5,52 ± 1,06 | 106 | 0,66 |
| Triazofos | Forestal | 1,56 | 1,64 ± 0,51 | 105 | 0,73 |
| | | 10,0 | 9,0 ± 0,4 | 90 | 2,03 |
| | Lapilli | 1,88 | 1,92 ± 0,96 | 102 | 0,13 |
| | | 10,0 | 8,6 ± 0,9 | 86 | 1,83 |

a) Media ± intervalo de confianza de cinco extracciones ($m = 5$). b) $t_{tab} = 2,78$, $m - 1 = 4$, $\alpha = 0,05$.

IV.6.4.- HF-LPME-HPLC-FD DE AGUAS

Con el objetivo de extender la validación del método, éste se aplicó a la preconcentración de los analitos de muestras de agua de diferente naturaleza (Milli-Q, mineral y de escorrentía). En la Tabla IV.6.3 se muestra el pH y la conductividad medida para dichas muestras.

Tabla IV.6.3.- Valores de pH y conductividad de las aguas seleccionadas.

| Parámetro | Agua | | |
|---|---------|---------|-------------|
| | Milli-Q | Mineral | Escorrentía |
| Tipo | Milli-Q | Mineral | Escorrentía |
| pH | 8,90 | 7,32 | 8,07 |
| Conductividad eléctrica a 25 °C (µS/cm) | 3,5 | 1628 | 41,0 |

Cuando el método se aplicó considerando las mejores condiciones obtenidas (2,0 cm de fibra impregnada en 1-octanol y 10 mL de agua a pH 9,0 conteniendo 20% (p/v) de NaCl), no fue posible alcanzar LODs por debajo de los LMRs establecidos por la UE para el consumo de agua potable (0,1 µg/L). Con el objetivo de disminuirlos, se incrementó el volumen de agua, manteniendo el resto de las condiciones, observando sin embargo una disminución de la eficacia de la extracción. Tras realizar diversas pruebas en las que se varió tanto el volumen de agua como la longitud de la fibra, las mejores condiciones resultaron ser 3,0 cm de fibra y 20 mL de agua a pH 9,0, conteniendo un 20% (p/v) de NaCl. De este modo, se alcanzó la misma eficacia de extracción que cuando se utilizaba un volumen de 10 mL y una fibra de 2,0 cm.

IV.6.4.1- VALIDACIÓN DEL MÉTODO HF-LPME-HPLC-FD PARA AGUAS

A continuación, también se obtuvieron las rectas de calibrado del método para los tres tipos de aguas, enriqueciendo 20 mL de cada tipo de agua a seis niveles de concentración diferentes ($n = 6$). Como se puede observar en la Tabla IV.6.4, se obtuvo una buena linealidad, con coeficientes de determinación (R^2) por encima de 0,996 en todos los casos. Los LODs oscilaron entre 0,2 ng/L y 0,05 µg/L para todos los analitos (muy por debajo de los LMRs establecidos por la UE), excepto para el 2-aminobenzimidazol y la carbendazima/benomilo, que oscilaron entre 0,39 y 0,57 µg/L. Estas diferencias se pueden atribuir a sus valores de K_{ow} . De hecho, tanto el 2-aminobenzimidazol como la carbendazima/benomilo, para los que se obtienen LODs

Tabla IV.6.4.- Datos de calibración del método HF-LMPE-HPLC-FD para los tres tipos de aguas.

| Plaguicida | Agua | Rango lineal ($\mu\text{g/L}$) | $b \pm t S_b$ | $a \pm t S_a$ | R^2 | LOD ^{a)} ($\mu\text{g/L}$) |
|-----------------------|-------------|-------------------------------------|---|---|-------|--|
| 2-Aminobenzimidazol | Milli-Q | 1,9-115 | $12,7 \times 10^4 \pm 0,2 \times 10^4$ | $-6,46 \times 10^4 \pm 11,34 \times 10^4$ | 0,999 | 0,54 |
| | Mineral | 1,9-115 | $12,7 \times 10^4 \pm 0,3 \times 10^4$ | $-15,5 \times 10^4 \pm 13,2 \times 10^4$ | 0,999 | 0,51 |
| | Escorrentía | 1,9-115 | $11,3 \times 10^4 \pm 0,6 \times 10^4$ | $19,2 \times 10^4 \pm 49,9 \times 10^4$ | 0,999 | 0,54 |
| Carbendazima/benomilo | Milli-Q | 1,4-140 | $11,8 \times 10^4 \pm 1,0 \times 10^4$ | $16,2 \times 10^4 \pm 70,1 \times 10^4$ | 0,996 | 0,39 |
| | Mineral | 1,4-140 | $12,9 \times 10^4 \pm 0,8 \times 10^4$ | $5,22 \times 10^4 \pm 56,22 \times 10^4$ | 0,998 | 0,42 |
| | Escorrentía | 1,4-140 | $9,09 \times 10^4 \pm 0,45 \times 10^4$ | $29,4 \times 10^4 \pm 31,4 \times 10^4$ | 0,999 | 0,57 |
| Tiabendazol | Milli-Q | 0,15-15 | $200 \times 10^4 \pm 15 \times 10^4$ | $-0,621 \times 10^4 \pm 80,230 \times 10^4$ | 0,994 | 0,04 |
| | Mineral | 0,15-15 | $180 \times 10^4 \pm 14 \times 10^4$ | $-9,20 \times 10^4 \pm 174,72 \times 10^4$ | 0,997 | 0,05 |
| | Escorrentía | 0,15-15 | $172 \times 10^4 \pm 4 \times 10^4$ | $15,0 \times 10^4 \pm 24,2 \times 10^4$ | 0,999 | 0,04 |
| Fuberidazol | Milli-Q | 0,0005-0,05 | $454 \times 10^6 \pm 20 \times 10^6$ | $-3,63 \times 10^4 \pm 52,46 \times 10^4$ | 0,999 | 0,0002 |
| | Mineral | 0,0005-0,05 | $441 \times 10^6 \pm 34 \times 10^6$ | $-41,3 \times 10^4 \pm 71,6 \times 10^4$ | 0,997 | 0,0002 |
| | Escorrentía | 0,0005-0,05 | $336 \times 10^6 \pm 12 \times 10^6$ | $15,1 \times 10^4 \pm 28,0 \times 10^4$ | 0,999 | 0,0002 |
| Carbaril | Milli-Q | 0,15-15 | $211 \times 10^4 \pm 2 \times 10^4$ | $-9,07 \times 10^4 \pm 13,83 \times 10^4$ | 0,999 | 0,02 |
| | Mineral | 0,15-15 | $189 \times 10^4 \pm 6 \times 10^4$ | $-8,30 \times 10^4 \pm 38,64 \times 10^4$ | 0,999 | 0,03 |
| | Escorrentía | 0,15-15 | $166 \times 10^4 \pm 8 \times 10^4$ | $0,430 \times 10^4 \pm 53,530 \times 10^4$ | 0,999 | 0,04 |
| 1-Naftol | Milli-Q | 0,15-15 | $102 \times 10^4 \pm 4 \times 10^4$ | $14,6 \times 10^4 \pm 26,1 \times 10^4$ | 0,999 | 0,01 |
| | Mineral | 0,15-15 | $96,8 \times 10^4 \pm 3,9 \times 10^4$ | $-6,65 \times 10^4 \pm 26,14 \times 10^4$ | 0,999 | 0,01 |
| | Escorrentía | 0,15-15 | $98,6 \times 10^4 \pm 7,1 \times 10^4$ | $-12,7 \times 10^4 \pm 47,8 \times 10^4$ | 0,997 | 0,02 |
| Triazofos | Milli-Q | 0,15-15 | $95,3 \times 10^4 \pm 1,8 \times 10^4$ | $6,92 \times 10^4 \pm 10,08 \times 10^4$ | 0,999 | 0,04 |
| | Mineral | 0,15-15 | $121 \times 10^6 \pm 2 \times 10^4$ | $-22,3 \times 10^4 \pm 13,1 \times 10^4$ | 0,999 | 0,04 |
| | Escorrentía | 0,15-15 | $88,4 \times 10^4 \pm 4,0 \times 10^4$ | $-8,81 \times 10^4 \pm 26,52 \times 10^4$ | 0,999 | 0,05 |

^{a)} Calculado como la concentración capaz de proporcionar una relación S/N de 3. b: pendiente. S_b: desviación estándar de la pendiente. a: ordenada en el origen. S_a: desviación estándar de la ordenada en el origen. R²: coeficiente de determinación ($n = 6$).

Tabla IV.6.5.- Estudio de precisión y exactitud del método HF-LPME-DLLME-HPLC-FD para los tres tipos de aguas.

| Plaguicida | Agua | Conc. añadida ($\mu\text{g/L}$) | Conc. encontrada ($\mu\text{g/L}$) ^{a)} | Exactitud (%) | t^b |
|-----------------------|-------------|-----------------------------------|--|---------------|-------|
| 2-Aminobenzimidazol | Milli-Q | 1,93 | 2,10 \pm 0,82 | 109 | 2,70 |
| | | 8,19 | 7,36 \pm 0,80 | 90 | 2,72 |
| | Mineral | 2,41 | 2,78 \pm 0,91 | 116 | 1,31 |
| | | 10,2 | 9,97 \pm 0,86 | 97 | 0,43 |
| | Escorrentía | 14,5 | 14,52 \pm 4,33 | 100 | 0,09 |
| | | 61,4 | 64,68 \pm 3,81 | 105 | 0,67 |
| Carbendazima/benomilo | Milli-Q | 10,8 | 10,81 \pm 5,85 | 100 | 0,01 |
| | | 45,9 | 41,61 \pm 5,24 | 91 | 1,54 |
| | Mineral | 10,8 | 10,37 \pm 4,29 | 96 | 0,67 |
| | | 45,9 | 42,07 \pm 3,76 | 92 | 2,03 |
| | Escorrentía | 10,8 | 11,89 \pm 3,21 | 110 | 2,34 |
| | | 45,9 | 43,80 \pm 2,76 | 95 | 0,70 |
| Tiabendazol | Milli-Q | 0,945 | 0,879 \pm 0,481 | 93 | 0,89 |
| | | 4,01 | 3,71 \pm 0,59 | 93 | 2,57 |
| | Mineral | 0,945 | 0,930 \pm 0,900 | 98 | 0,32 |
| | | 4,01 | 3,85 \pm 0,86 | 96 | 0,66 |
| | Escorrentía | 0,945 | 0,930 \pm 0,475 | 99 | 0,32 |
| | | 4,01 | 4,02 \pm 0,41 | 100 | 0,08 |

(Continúa en la página siguiente)

Tabla IV.6.5.- (Continuación)

| Plaguicida | Agua | Conc. añadida ($\mu\text{g/L}$) | Conc. encontrada ($\mu\text{g/L}$) ^{a)} | Exactitud (%) | \bar{p} ^{b)} |
|-------------|-------------|-----------------------------------|--|---------------|-------------------------|
| Fuberidazol | Milli-Q | 0,004 | $0,004 \pm 0,001$ | 92 | 2,28 |
| | | 0,018 | $0,017 \pm 0,001$ | 95 | 1,65 |
| | Mineral | 0,004 | $0,005 \pm 0,002$ | 107 | 1,80 |
| | | 0,018 | $0,017 \pm 0,001$ | 90 | 1,71 |
| | Escorrentía | 0,004 | $0,005 \pm 0,001$ | 109 | 0,75 |
| | | 0,018 | $0,019 \pm 0,001$ | 104 | 0,90 |
| Carbaril | Milli-Q | 1,04 | $0,96 \pm 0,07$ | 92 | 1,84 |
| | | 4,41 | $4,33 \pm 0,07$ | 98 | 0,46 |
| | Mineral | 1,04 | $1,14 \pm 0,20$ | 109 | 2,70 |
| | | 4,41 | $4,10 \pm 0,17$ | 93 | 2,77 |
| | Escorrentía | 1,04 | $1,04 \pm 0,32$ | 100 | 0,00 |
| | | 4,41 | $4,35 \pm 0,29$ | 99 | 0,33 |
| 1-Naftol | Milli-Q | 1,08 | $0,97 \pm 0,25$ | 90 | 1,53 |
| | | 4,58 | $4,76 \pm 0,22$ | 104 | 0,90 |
| | Mineral | 1,08 | $1,10 \pm 0,26$ | 102 | 0,79 |
| | | 4,58 | $4,47 \pm 0,24$ | 98 | 0,38 |
| | Escorrentía | 1,08 | $1,02 \pm 0,47$ | 95 | 0,84 |
| | | 4,58 | $4,31 \pm 0,43$ | 94 | 1,33 |
| Triazofos | Milli-Q | 1,07 | $0,96 \pm 0,11$ | 90 | 0,82 |
| | | 4,54 | $4,86 \pm 0,11$ | 107 | 1,51 |
| | Mineral | 1,07 | $1,07 \pm 1,67$ | 100 | 0,07 |
| | | 4,54 | $4,25 \pm 1,58$ | 94 | 0,97 |
| | Escorrentía | 1,07 | $1,07 \pm 0,30$ | 100 | 0,02 |
| | | 4,54 | $4,25 \pm 0,27$ | 94 | 2,70 |

a) Media \pm intervalo de confianza de cinco extracciones ($m = 5$). b) $t_{\text{tab}} = 2,78$ para $m - 1 = 4$, $\alpha = 0,05$.

más altos, son los analitos con un K_{ow} más bajo (0,91 y 1,48/1,40, respectivamente).

Al igual que con las muestras de suelo, también se llevó a cabo un estudio de precisión y exactitud a dos niveles de concentración por quintuplicado ($n = 5$), obteniendo una concordancia entre la concentración añadida y la encontrada entre el 90 y el 110% (Tabla IV.6.5).

IV.6.5.- CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en esta sección, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- Se desarrolló un método basado en la utilización de la HF-LPME para la extracción de un grupo de plaguicidas y algunos metabolitos, de aguas y extractos de suelos. Los factores que afectan la extracción se estudiaron paso a paso para obtener las mejores condiciones.
- Las mejores condiciones del procedimiento HF-LPME fueron las siguientes: una fibra de 2,0 cm utilizando 1-octanol como fase aceptora para la extracción de 10 mL de extracto acuoso de suelo a pH 9,0 conteniendo un 20% (p/v) de NaCl, con un tiempo de extracción de 30 min y una agitación de 1440 rpm.
- La validación del método UAE-HF-LPME-HPLC-FD se llevó a cabo realizando un calibrado de método y un estudio de precisión y exactitud en dos suelos con propiedades fisicoquímicas diferentes. El método resultó ser rápido, sencillo, efectivo y repetible, obteniendo LODs en el rango de los ng/g. Estos valores fueron comparables, o incluso mejores, que los obtenidos en otros trabajos previamente publicados y que también incluían un procedimiento de HF-LPME para la determinación de plaguicidas en extractos de suelos.
- El método también fue aplicado a la extracción de los analitos de tres tipos de aguas, empleando una fibra de 3,0 cm para extraer 20 mL de agua en las mismas condiciones obtenidas anteriormente. También en este caso, se llevó a cabo un calibrado del método para cada matriz, así como un estudio de precisión y exactitud. Se alcanzaron LODs inferiores a los LMRs legislados en la UE (0,1 $\mu\text{g/L}$), excepto para el 2-aminobenzimidazol y la carbendazima/benomilo, que son los dos analitos con el menor valor de K_{ow} .

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES GENERALES

V.- CONCLUSIONES GENERALES

Del trabajo experimental, los resultados y las conclusiones específicas obtenidas en la presente Tesis Doctoral, se pueden extraer las siguientes conclusiones generales:

- Se desarrollaron distintas metodologías analíticas para la determinación de diferentes grupos de plaguicidas y algunos de sus metabolitos, de diferentes familias químicas (como OPPs, benzimidazoles, triazinas, carbamatos, etc.) en suelos con diferentes propiedades fisicoquímicas y procedencia (forestal, ornamental, agrícola, de jardín y lapilli), así como en aguas de diferente naturaleza (Milli-Q, mineral y de escorrentía).
- Se aplicaron con éxito diferentes técnicas de separación como la CE, la GC, la HPLC convencional y la nano-LC, estudiando asimismo diferentes métodos de preconcentración en línea. En este sentido se utilizó la inyección electrocinética en CE y se estudió la focalización en columna y el uso de un sistema 2D con el empleo de una micro-precolumna en nano-LC, logrando aumentar la sensibilidad de estas técnicas.
- Se utilizaron diferentes métodos de extracción y preconcentración fuera de línea, como la UAE, el método QuEChERS, la SPE, la DLLME y la HF-LPME para el análisis de plaguicidas y algunos de sus metabolitos en suelos. Por otra parte, se empleó la SPE (en modo convencional y dispersivo) y la HF-LPME para determinar estos analitos en aguas.
- Se demostró la utilidad y efectividad del uso de nuevos materiales como los MWCNTs como fases estacionarias en SPE, y de los ILs como disolventes de extracción en DLLME. En particular, se sintetizó y aplicó el IL [PPIm][PF₆] para la extracción de plaguicidas y sus metabolitos, siendo la primera vez que se utilizaba para este fin.
- La combinación de las técnicas de preconcentración en y fuera de línea permitió alcanzar LODs adecuados para el análisis de residuos de plaguicidas en aguas a niveles inferiores a los LMRs establecidos por la UE (0,1 µg/L), así como a niveles de ng/g en el caso de los suelos.

- Las metodologías desarrolladas se validaron mediante estudios de calibración, repetibilidad, recuperación, precisión y exactitud en diferentes tipos de suelo y aguas, mostrando en todos los casos resultados satisfactorios desde un punto de vista analítico.

ENGLISH SUMMARY

ENGLISH SUMMARY

CHAPTER I. INTRODUCTION

In this chapter, a general introduction about the state of the art of pesticide analysis in soils and waters is given. Special emphasize has been done in describing the analytical tools which are nowadays available for this propose.

I.1.- PESTICIDES

Agriculture has played a key role in the development of human civilization. It is an old practice that has rarely been questioned because of the increasing need of feeding the world's population (CARVALHO, 2006). Modern agronomic techniques including the massive use of fertilizers and pesticides have sharply increased these production yields. However, negative effects on human health as well as important environmental damage have been caused, especially after the second half of the 20th century in which great amounts of pesticides were released (and are still being released) into the environment.

These products are used in many situations such as livestock farming, cropping, forestry, home gardening, horticulture, roadsides, etc. Once they are applied, they should stay, in an ideal manner, in the area of interest until the desired effect is achieved and then, they should degrade into harmless products. The truth is that this does not fully happen and that they strongly tend to move off-site due to the effects of wind drift, leaching, run-off, etc. also depending on several parameters such as the chemical properties and persistence of the pesticide, application technique and rate, rain frequency and irrigation and last, but not least, soil properties, such as organic carbon content (K_{oc}) (PIERZYNSKI ET AL., 2000).

The study of the capability of soils to retain, filter and degrade pesticides is important nowadays since the presence and bio-availability of pesticides in this medium can impact human and animal health in a detrimental manner and can also move off-site, contaminating surface water, and also groundwater, causing harm on aquatic ecosystems (ELLIOTT ET AL., 2000).

From the beginning of the 1960s, and above all, in the last decade, the

European Union (EU) has been contemplating a group of disciplinary actions to fight environmental problems. In this sense, a Community framework for water protection and management has been developed. This is described in Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000, which involves a group of objectives, such as preventing and reducing pollution. Regarding pesticides, the Community framework for water protection and management establishes in part B of annex I of Directive 98/83/CE of 3 November 1998, that the concentration of an individual pesticide must not exceed 0.10 µg/L in drinking water, while total concentration of pesticides must not exceed 0.50 µg/L.

The Commission has also proposed a framework and common objectives to prevent soil degradation, to preserve soil functions and to remediate degraded soil in the Communication COM (2006) 231, of 22 September 2006 (not published in the Official Journal of the European Union). However, there is still no consensus between all Member States in this regard and it still remains as a proposition.

That is why it is of special importance to develop rugged and robust methodologies able to determine these compounds at very low concentrations in this type of environmental matrices.

I.2.- CHROMATOGRAPHIC AND ELECTROPHORETIC SEPARATION TECHNIQUES IN PESTICIDE ANALYSIS IN ENVIRONMENTAL SAMPLES

Nowadays, gas chromatography (GC) is, without any doubt, the separation technique most frequently employed for pesticide analysis. More than 60% of registered pesticides and their metabolites can be detected by GC (SANTOS AND GALCERÁN, 2002), due to their relatively high volatility and great thermal stability. The main advance in GC in the last decades has been the growth of the so-called rapid GC, which exploits shorter analysis times than conventional GC. This is reached by varying experimental parameters, such as column length, internal diameter (i.d.), type of stationary phase, its thickness, nature of the carrier gas, temperature gradient, etc. (MATISOVÁ AND DŮMŤŮROVÁ, 2003). Also, the introduction of multidimensional GC (MDGC), both heart cut (H/C MDGC) and comprehensive (GCxGC), has been an important advance that allows an

excellent characterization of complex samples (HERRERO ET AL., 2009).

However, GC is not suitable for low volatility, thermally unstable or high polar pesticides. This has encouraged the use of liquid chromatography (LC), which theoretically, might be applied to any kind of organic compound. Although this technique can be considered as a mature technique, it has experimented different advances, such as the use of monolithic columns (OLSEN ET AL., 2006), the use of ultra-performance LC (UHPLC) by using sub-2 μm particles as stationary phases (NGUYEN ET AL., 2006) or the introduction of core-shell technology (NÚÑEZ ET AL., 2012). Of course, multidimensional LC (MDLC), both H/C MDLC and comprehensive LCxLC, is also a current tendency, especially in the proteomic field (TANG ET AL., 2008; ZHANG ET AL., 2010a; DONATO ET AL., 2011). However, applications in the pesticide field are still scarce (HERRERO ET AL., 2009).

The main disadvantage of HPLC is the great consumption of solvents that it implies. Nano-liquid chromatography (nano-LC) and capillary liquid chromatography (CLC) are miniaturized techniques in which the separation takes place in a capillary column of i.d. between 10-100 μm for nano-LC and from 100 μm to 500 μm for CLC (VISSERS ET AL., 1997). Capillaries are packed with the stationary phases frequently applied in HPLC, obtaining high efficiencies and good resolution. The use of miniaturized columns leads to the employment of smaller amounts of stationary phase, consumption of minor amounts of eco-harmful solvents due to the low working flow rates (nL/min), and reduction of costs. For these reasons, it may possibly be considered as an environmentally friendly technique (HERNÁNDEZ-BORGES ET AL., 2007). Also these low flow rates lead to another interesting advantage, which is the facility of its coupling with mass spectrometry (MS). However, due to the small injection volumes and to the small path length on detection, it lacks of good sensitivity. In order to increase the sensitivity, apart from the use of sensitive and specific detectors (MS) or extended path length cells, some approaches have been proposed, such as the use of on-column focusing (VISSERS ET AL., 1996) or 2D systems with the use of micro-precolumns.

On the other hand, capillary electrophoresis (CE) is perhaps the most consolidated miniaturized technique. It owns a high versatility, possibly due to the numerous separation modes in which it can be performed: capillary zone

electrophoresis (CZE), non-aqueous capillary electrophoresis (NACE), micellar electrokinetic chromatography (MEKC), capillary electrochromatography (CEC), capillary gel electrophoresis (CGE), capillary isoelectrofocusing (CIEF), capillary isotachopheresis (CITP), etc., each of them offering different separation mechanisms and selectivity.

Like for nano-LC and CLC, the main disadvantage of CE is its low sensitivity due to the short optical path length and low injection volumes (BURGI AND BRADEN, 2008; LANDERS, 2008). Apart from stacking and sweeping techniques, electrokinetic injection has been frequently and extensively applied due to its instrumental simplicity and its effectiveness in increasing sensitivity. When the sample conductivity is lower than that of the background electrolyte (BGE), the phenomenon is called field-amplified sample stacking (FASS) or field-enhanced sample injection (FESI) (CHIEN AND BURGI, 1991, 1992).

The employment of aqueous BGEs in CZE is limited to the separation of polar analytes, while non-polar analytes always require the addition of additives such as surfactants or organic co-solvents. The use of organic media (NACE) has extended the application of CE (RIEKKOLA ET AL., 2000; RIEKKOLA, 2002; LAURENT AND JEAN-LUC, 2009), because it makes possible to work with BGEs of different dielectric constants, polarities, viscosities, acid-base properties, etc. The correct selection of one or a mixture of solvents allows getting more selective separations than in aqueous medium due to different phenomena like hydrogen bonding, changes in the pH scale, changes in the pK_a of the analytes, heteroconjugation, dipolar interactions, etc.

I.3. - NEW TRENDS IN SAMPLE PREPARATION FOR PESTICIDE ANALYSIS

I.3.1. - NEW MATERIALS AND SOLVENTS

One of the main trends in sample preparation is the employment of new materials and solvents that allow the development of alternative techniques that result always more selective, simpler, safer and less contaminant. This research area is indeed an important field in current Analytical Chemistry.

During the last twenty years, carbon nanotubes (CNTs) have become one of the most studied materials because of their unique properties (YING ET AL.,

2011), which include, among others, having a high tensile strength which can be more than 100 times that of stainless steel, high thermal conductivity comparable to that of diamond, stability and resilience, as well as different electrical properties. They can also be excellent conductors (comparable to copper), or semiconductors, depending on the arrangement of the graphene sheet.

As a result of this wide, interesting and multidisciplinary research, they have found applications in different fields, also in Analytical Chemistry. In this sense, probably the most important field of application has been their use as sorbents, both as stationary phases in solid-phase extraction (SPE) and as coatings for solid-phase microextraction (SPME) fibers (PYRZYNSKA, 2011). Their huge surface area, the high number of cavities in their structure (especially in the case of multi-walled CNTs, MWCNTs), their good capacity to retain hydrophobic molecules, their ability to establish π - π interactions and their facility to be functionalized make them ideal materials in this sense.

Regarding new solvents, ionic liquids (ILs), which are salts with quite large ions that own low melting points (≤ 100 °C), have also become important in the last decade. Most of them are molten salts, called room temperature ILs (RTILs) (WELTON, 1999), which possess very attractive physicochemical properties, such as low vapor pressure and low volatility, electrochemical stability, good electrical conductivity, long range of viscosity, reusability, low inflammability, etc. (SUN AND ARMSTRONG, 2010). Such properties depend on the anion and cation nature which can be tunable, so they are also considered as solvents of design.

ILs have found one of their widest application field in sample preparation as solvents in different extraction techniques (LIU ET AL., 2009A), due to their ability to solubilize either inorganic and organic molecules. In this sense, they have been used in liquid-liquid extraction (LLE) (ARCE ET AL., 2008), in liquid-phase microextraction (LPME) techniques, and also in SPME as coating materials (AGUILERA-HERRADOR ET AL., 2010).

I.3.2.- MODERN SAMPLE PREPARATION TECHNIQUES

I.3.2.1.- DISPERSIVE SOLID-PHASE EXTRACTION (dSPE) AND THE QuEChERS METHOD

Nowadays, SPE is, without any doubt, the preferred and more exploited preparation technique, also in the pesticide analysis field. In the last decades it has experienced an important development, above all by the introduction of new sorbents, like molecularly imprinted polymers (MIPs) (BELTRÁN ET AL., 2010), restricted access materials (RAM) (SADÍLEK ET AL., 2007), immunoadsorbents (BOUZIGE AND PICHON, 1998), CNTs (TROJANOWICZ, 2006), etc. Also, advances have been focused on its format and automation.

Dispersive SPE (dSPE) have been introduced as a modification in the conventional format of performing SPE. In it, the extraction is not carried out in a column or in a disk, but in the bulk solution. The stationary phase is added to the aqueous sample containing the analytes and after an appropriate extraction time, the sorbent is separated from the sample, dried and analytes are eluted or desorbed with a suitable solvent. As one can deduce, its performance is easier, faster and less tedious.

Nevertheless, what is normally intended is to use the sample extraction solvent as the dissolving solvent in the dSPE step, as it occurs in the QuEChERS method. In fact, the majority of works that concern dSPE of pesticides deals with this method claimed to be *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe* (ANASTASSIADES ET AL., 2003). The QuEChERS method was originally developed for the extraction of pesticides from fruit and vegetable samples and has reached a strong popularity due to the simplicity of the sample pretreatment procedure. In fact, several modifications have been introduced with the aim of applying it for the analysis of other types of analytes in other matrices such as veterinary drugs in milk (AGUILERA-LUIZ ET AL., 2008; KINSELLA ET AL., 2009), liver (KINSELLA ET AL., 2009) or pig blood (PLOSSL ET AL., 2006).

I.3.2.2.-LIQUID-PHASE MICROEXTRACTION (LPME)

Over the last years, some new miniaturized extraction procedures have been introduced with success, which can be grouped in the so-called LPME techniques, which emerged from liquid-liquid extraction (LLE) (PSILLAKIS AND

KALOGERAKIS, 2003).

LPME normally takes place between several microliters of a water-immiscible solvent (known as extractant or acceptor phase) and an aqueous phase (also known in some cases as donor phase) which contains the analytes of interest. In general, LPME techniques combine extraction and preconcentration in a single step with a low consumption of solvent and time.

These techniques can be classified in three categories: single-drop microextraction (SDME), hollow-fiber liquid phase microextraction (HF-LPME) and dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME). Among them, DLLME is probably the most successful LPME category, due to its simplicity of operation. However, the three of them have been applied for pesticide analysis in different fields (LAMBROPOULOU AND ALBANIS, 2007), especially for the analysis of water samples.

CHAPTER II. OBJECTIVES

This PhD Thesis was evolved with the main objective of developing new, rapid and selective analytical methodologies, which involved the use of low amounts of organic solvents, for the determination of pesticides in matrices of environmental interest, such as waters and soils. This main objective covers other more specific goals:

- To exploit different separation techniques, such as CE, GC, HPLC and nano-LC with different detection systems, to obtain a suitable resolution of different groups of pesticides and some of their metabolites.
- To employ on-line preconcentration techniques in CE and nano-LC, with the aim of increasing the sensitivity of both techniques.
- To apply diverse extraction and off-line preconcentration procedures for soil analysis, such as UAE, the QuEChERS method, conventional SPE, DLLME and HF-LPME. Likewise, to employ techniques like SPE (both in conventional or dispersive modes) and HF-LPME for the analysis of waters.
- To study the application of new materials such as MWCNTs as stationary phases in SPE and of new extraction solvents such as ILs in DLLME.
- To validate the developed methodologies through calibration, repeatability,

recovery, precision and accuracy studies.

- To obtain the LODs and LOQs of the methods which permit the analysis of pesticide residues and some of their metabolites at the concentration levels required by the EU legislation (in the case of waters) and at a concentration in the low ng/g level (in the case of soils).
- To apply the developed methodologies for the analysis of the target analytes in soils with different physicochemical properties and waters of different nature.

CHAPTER III. MATERIALS AND METHODS

This chapter describes the experimental part of this PhD Thesis, including chemicals and reagents, software, instrumental conditions and sample pretreatment.

CHAPTER IV. RESULTS AND DISCUSSION

IV.1.- DETERMINATION OF PESTICIDES IN WATERS BY NON-AQUEOUS CAPILLARY ELECTROPHORESIS EMPLOYING MULTI-WALLED CARBON NANOTUBES AS STATIONARY PHASES IN SOLID-PHASE EXTRACTION

NACE exploits the physical and chemical properties of organic solvents to control the electroosmotic flow (EOF) and analyte migration. Besides, the low currents present in NACE systems allow the application of high electric fields, the use of higher concentrations of BGEs as well as capillaries with wider i.d. It has also demonstrated to have a high compatibility with MS detection (YANG ET AL., 1999). Regarding the applications of NACE in environmental sciences, only a relatively low number of reports had shown its potential for the determination of pesticides at the time of the development of the present PhD Thesis. It had only been applied for the analysis of triazines in waters (CARABIAS-MARTÍNEZ ET AL., 1999, 2000, 2002, 2006b), and vegetables (CARABIAS-MARTÍNEZ ET AL., 2007; RODRÍGUEZ-GONZALO ET AL., 2009), as well as fenoxicarb in wheat (LIU ET AL., 2008b), neutral organophosphorus pesticides (OPPs) in soils (HUANG ET AL., 2007) and 2,4-D and 2,4,5-T in tobacco (LIU ET AL., 2006). In other works, NACE has been mostly used for the theoretical study of the effects that non-aqueous medium produces in other separation parameters, using model compounds (CARABIAS-MARTÍNEZ ET AL., 1997, 2006a; MENZINGER ET AL., 2001).

Among the different CNTs available, MWCNTs had only been used in few occasions for the extraction of pesticides from water samples and only in combination with either GC or HPLC (ZHOU ET AL., 2006b, 2007a; WANG ET AL., 2007; EL-SHEIKH ET AL., 2007; EL-SHEIKH ET AL., 2008; MIN ET AL., 2008; KATSUMATA ET AL., 2008), while single-walled CNTs (SWCNTs) had not been used for this purpose. Regarding the combination with CE, only in two occasions anti-inflammatory drugs (SUÁREZ ET AL., 2007b) and tetracycline antibiotics (SUÁREZ ET AL., 2007a) were extracted from urine and surface waters, respectively. However, CNTs-SPE had not been applied for the extraction of pesticides in combination with CE.

The most employed MWCNTs up to that moment were those with external diameters (e.d.) between 30-60 nm (ZHOU ET AL., 2006a, 2006b, 2006c, 2006d, 2007a, 2007b, 2007c, 2008b) and 40-60 nm (EL-SHEIKH ET AL., 2007, 2008; WANG ET AL., 2007; MIN ET AL., 2008; AL-DEGS AND AL-GHOUTI, 2008; AL-DEGS ET AL., 2009). Only in few works, MWCNTs of other dimensions were used, such as 3-10 nm (KATSUMATA ET AL., 2008), 5-10 nm (BIESAGA AND PYRZYNSKA, 2006) or 10-20 nm (EL-SHEIKH ET AL., 2007).

The aim of this first section was the development of a new strategy that permitted the determination of a group of seven pesticides (*i.e.* pirimicarb, pyrifenox, penconazol, carbendazim, cyromazine, pyrimethanil and cyprodinil) in mineral water samples using ametryn as internal standard (IS), at the maximum residue limits (MRLs) required by the EU, that combined SPE-NACE-UV, using economical CNTs in the extraction step. To the best of our knowledge, this was the first time that these pesticides were separated by NACE and extracted by SPE using MWCNTs as stationary phases. It also represented the first report on the combined used of MWCNTs-SPE and CE for the analysis of pesticides.

The optimized BGE, consisting of 1:2 (v/v) methanol (MeOH)/acetonitrile (ACN) with 90 mM sodium dodecyl sulfate (SDS) and 20.5 mM HClO₄, was satisfactory to achieve a good resolution of the seven compounds in less than 13 minutes obtaining LODs between 8.80-26.2 µg/L. On-line preconcentration was carried out by electrokinetic injection of the sample dissolved in 78:22 (v/v) MeOH/ACN with 1.11 mM HClO₄. Repeatability was studied for the same day ($n = 4$), for nine different days ($n = 36$) and four different capillaries. Relative standard deviation (RSD) values were appropriate in all cases, *i.e.* in the range

4.3-9.4% between different capillaries. MWCNTs of 10-15 nm o.d., 2-6 nm i.d. and 0.1-10 μm length were used as SPE extraction materials for the preconcentration of these pesticides from water samples. SPE parameters influencing the enrichment were optimized and the most favorable conditions were as follows: amount of stationary phase, eluent, sample pH and sample volume were 40 mg MWCNTs, 10 mL ACN and 10 mL dichloromethane (DCM) both containing 5% v/v formic acid, pH 8.0 and 750 mL, respectively. Mean recovery values ranged between 53 and 94% for Milli-Q water and between 47 and 93% for mineral water (RSD values were in the range 2-16%). The method allowed the determination of these pesticides at concentrations below the MRLs established by the EU legislation (LODs in the range 0,027-0,058 $\mu\text{g/L}$), except for cyromazine, which could not be quantitatively extracted. When the cost, amount and type of the CNTs used in this work were compared with those CNTs previously used in the literature it is clear that the proposed materials can be used as economical stationary phases, even cheaper than conventional SPE cartridges.

IV.2.- DETERMINATION OF PESTICIDES IN SOILS BY GAS CHROMATOGRAPHY USING MULTI-WALLED CARBON NANOTUBES AS STATIONARY PHASES IN SOLID-PHASE EXTRACTION

The strong binding of pesticides into soil matrices and the low concentrations at which these compounds appear require special and efficient extraction techniques. In this sense, it is very frequent to develop an extraction with a suitable organic solvent accomplished by agitation or sonication and, afterwards, a clean-up step using SPE cartridges (ANDREU AND PICÓ, 2004) prior to their GC determination, which is the most frequent method of choice. Most clean-up procedures developed have used conventional C_{18} cartridges.

The majority of CNTs applications published had been developed for the extraction of water samples. Concerning the application of CNTs for the extraction of organic compounds from complex matrices (different than waters), they had been used for the extraction of barbiturates (ZHAO ET AL., 2007) and diazepines (WANG ET AL., 2006b) from pork meat extracts, polibrominated diphenyl ethers from milk (WANG ET AL., 2006a), sulfonamides in eggs and pork (FANG ET AL., 2006), antidepressants from urine (CRUZ-VERA ET AL., 2008), volatile organic compounds like benzene, toluene,

butyl acetate, ethylbenzene, xylene, styrene and undecane in indoor air (LIU ET AL., 2008a) and peptides from plasma (LI ET AL., 2007).

Only five manuscripts had reported the use of CNTs (basically MWCNTs) for the extraction of pesticides from matrices different than waters, until the development of this work. This is the case of the extraction of chlortoluron, diuron, atrazine, simazine, desetil-terbutilazine, dimethoate, malathion and parathion from virgin olive oil (LÓPEZ-FERIA ET AL., 2009), methyl-parathion, paraoxon and fenitrothion from garlic extracts (DU ET AL., 2008), ethoprophos, diazinon, chlorpyrifos-methyl, fenitrothion, malathion, chlorpyrifos, fenamiphos and buprofezin from fruit juices (RAVELO-PÉREZ ET AL., 2008a), tryethylphosphorothioate, thionazin, sulfotep, phorate, disulfoton, methyl parathion and ethyl parathion from sewage sludge (BASHEER ET AL., 2006) and atrazine, deisopropyl-atrazine and diethylatrazin from soils (MIN ET AL., 2008). This last report constitutes the only work published until now dealing with the use of CNTs in the extraction of pesticides from soils, however, the number of pesticides analyzed is very reduced and thus the full potential of CNTs for this purpose is still unknown. From the revision of this relatively low number of works it is clear that CNTs have a high potential for the extractions of organic compounds of different nature from very complex matrices and that further applications are highly necessary in order to expand their possibilities as new extracting materials.

In this second section, a new, simple and cost-effective method based on the use of MWCNTs as SPE stationary phases is proposed for the determination of a group of seven OPPs (*i.e.* ethoprophos, diazinon, chlorpyrifos-methyl, fenitrothion, malathion, chlorpyrifos and phosmet) and one thiadiazine (buprofezin) in different types of soil samples (forestal, ornamental and agricultural) using GC with NPD. Triphenylphosphate (TPP) was used as IS. Soils were first extracted with an ultrasound-assisted extraction (UAE) with 10 mL of 1:1 (v/v) MeOH/ACN and the evaporated extract, which was redissolved in 20 mL of water (pH 6.0), was passed through a cartridge filled with 100 mg of MWCNTs of 10-15 nm o.d., 2-6 nm i.d. and 0.1-10 μm length. Elution was carried out with 20 mL DCM. The method was validated in terms of linearity, precision, recovery, accuracy and selectivity. Matrix-matched calibration was carried out for each type of soil since statistical differences between the calibration curves in pure solvent

and in the reconstituted soil extract were found for most of the pesticides under study. Recovery values of spiked samples ranged between 54 and 91% for the three types of soils (LODs between 2.97 and 9.49 ng/g), except for chlorpyrifos, chlorpyrifos-methyl and buprofezin which ranged between 12 and 54% (LODs between 3.14 and 72.4 ng/g), which are the pesticides with the highest soil organic carbon sorption coefficient (K_{oc}) values. Using a one-sample test (*Student's t-test*) with fortified samples at two concentration levels in each type of soil, no significant differences were observed between the real and the experimental values (accuracy percentages ranged between 87 and 117%). It was the first time that the adsorptive potential of MWCNTs for the extraction of OPPs from soils was investigated.

IV.3.- MULTI-WALLED CARBON NANOTUBES-DISPERSIVE SOLID-PHASE EXTRACTION COMBINED WITH NANO-LIQUID CHROMATOGRAPHY FOR THE ANALYSIS OF PESTICIDES IN WATER SAMPLES

From a review of the literature, it is clear that proteomics is, among all, the biggest application area for nano-LC. However, it has not been so widely applied in other important fields, in particular, for the analysis of pesticides, in which the number of publications is still relatively low. Besides, in most of these cases the studies have been focused on the evaluation of special instrumentation for this miniaturized technique (MONETI ET AL., 2001; CAPPIELLO ET AL., 2002b, 2003) or for the examination of its capability to separate or enantioseparate groups of pesticides (ROSALES-CONRADO ET AL., 2004; FANALI ET AL., 2006). Regarding environmental samples, only few works have been developed (CAPPIELLO ET AL., 2002b; FAMIGLINI ET AL., 2005, 2008). As a result, new studies are welcome in order to fully explore the potential of this technique in the environmental field analysis.

In general, the bottleneck of conventional SPE is the sample loading step which can be performed by gravity flow or pressure/vacuum-assisted. Depending on the instrumental LOD and therefore, on the amount of sample to be extracted, sample loading can require a relatively long period of time since flow rate is a critical parameter. Although it is not widely performed, sorbent materials can be used in the dispersive mode with the aim of trapping the target analytes, which are later eluted or desorbed with an appropriate solvent (TSAI ET AL., 2009; LU ET AL., 2010; PENG ET AL., 2010). In this way, extraction time is reduced.

As stated before, CNTs had been used for the extraction of organic and inorganic analytes, including pesticides (PYRZYNSKA, 2011). However, practically in all these applications, the extraction was carried out in the conventional mode in laboratory-made cartridges, because they are not still commercially available. Only in a few cases, SPE under the dispersive mode had been applied for the extraction of metallic ions with oxidized-MWCNTs (ZANG ET AL., 2009), quinolones with magnetic MWCNTs (MORALES-CID ET AL., 2010) and cationic surfactants with oxidized-MWCNTs (SHRIVAS AND WU, 2008).

In this third section, the simultaneous separation of a group of twelve pesticides (carbaryl, fensulfothion, mecoprop, fenamiphos, haloxyfop, diclofop, fipronil, profenofos, fonofos, disulfoton, nitrofen and terbufos) by nano-LC with UV detection is described. For the analyses, a 25 cm x 100 μm i.d. capillary column packed with silica modified with phenyl groups (Pinnacle II Phenyl) was used. Experimental parameters, including the use of on-column focusing and the use of a 2D system employing a trapping column for increasing the sensitivity, were optimized and validated. A preliminary study of the applicability of a rapid and practical dSPE procedure, was developed for the extraction of some of these pesticides (carbaryl, fensulfothion, fenamiphos, fipronil, profenofos, fonofos, disulfoton, nitrofen and terbufos) from 100 mL of Milli-Q water samples at pH 4.0, using 90 mg of MWCNTs, 15 min of extraction time and 30 mL DCM for elution. The method was validated through a recovery study at three different levels of concentration, achieving recoveries between 71-102% for most of them, except for profenofos, disulfoton, nitrofen and terbufos which were in the range 36-64%. In all cases, RSD values lower than 17% were obtained. LODs were in the range 0.016-0.067 $\mu\text{g/L}$ (below EU's MRLs) for the majority of the pesticides. Furthermore, MWCNTs were reused up to 5 times, representing an important reduction of the waste of stationary phase.

Pristine MWCNTs had never been used for the extraction of organic analytes in dSPE, and in any case for the extraction of pesticides. On the other hand, this work constitutes the first application of the combined use of CNTs-SPE with nano-LC, also being the first time that the selected group of analytes had been simultaneously separated with the aforementioned technique. dSPE permitted a clear diminution of the sample treatment time with respect to conventional SPE.

IV.4.- EVALUATION OF A MODIFIED QuEChERS METHOD FOR THE EXTRACTION OF PESTICIDES FROM SOILS

The QuEChERS method and several modified versions had been lately applied for the extraction of different types of pesticides from, above all, fruits and vegetables. In a much lesser extent, it had also been applied to the extraction of pesticides from other kind of foodstuff as, for instance, cereals (NGUYEN ET AL., 2007, 2008; WALORCZYK, 2007, 2008; KOESUKWIWAT ET AL., 2008), meat based baby-food (PRZYBYLSKI ET AL., 2009), milk (LEHOTAY ET AL., 2005b; KEEGAN ET AL., 2009) and medicinal herbs (NGUYEN ET AL., 2009). Besides, it has also been used for the determination of different analytes, such as veterinary drugs in milk (AGUILERA-LUIZ ET AL., 2008; KINSELLA ET AL., 2009), kidney (KINSELLA ET AL., 2009) and pig blood (PLOSSL ET AL., 2006) or polycyclic aromatic hydrocarbons from fish (RAMALHOSA ET AL., 2009).

Although this method has provided good results for the extraction of pesticides of different polarities in non-fatty foods, it is also interesting to fully state if it can be applied to the analysis of these compounds in other more complex matrices like soils, in which pesticides tend to frequently occur. In this sense, to the best of our knowledge, the QuEChERS method had only been applied to the extraction of pesticides from soils in four occasions (LESUEUR ET AL., 2008; CHEN ET AL., 2009; DROŹDŹYŃSKI AND KOWALSKA, 2009; DONG ET AL., 2009) using in all cases MS detection. However, in three of these works (CHEN ET AL., 2009; DROŹDŹYŃSKI AND KOWALSKA, 2009; DONG ET AL., 2009), a very small number of pesticides was analyzed. In particular, Chen et al. (2009) developed a modified QuEChERS method for the analysis of only one pesticide, procymidone, in leeks and soils to study its dissipation, obtaining recovery values between 75 and 101% and LODs in the range 20-175 ng/g. In the second of these works, developed by Drożdżyński et al. (2009) only three pesticides, namely azadirachtin, spinosad and rotenone, were determined in soil by QuEChERS-UHPLC-MS with recovery values between 67 and 108% (depending on the matrix and the spiking level) and LODs between 1.8 and 3.6 ng/g. In the third work, Dong et al. (2009) analyzed metaflumizone by QuEChERS-UHPLC-MS/MS with recovery values between 78 and 85% (LOD of 1 ng/g). Only in one occasion (LESUEUR ET AL., 2008), a relatively higher number of pesticides (twenty-four) was analyzed (twelve were analyzed using GC-MS and the rest by HPLC-MS/MS). However, the aim of that work was to compare the extraction efficiency of a new

UAE procedure with three extraction methods (including the direct application of the QuEChERS), and not to study in depth the use of the application of the QuEChERS method. In fact, for some of the pesticides it was even stated the need of studying in further works possible matrix effects since recovery values higher than 120% were obtained in some cases.

With the aim of studying in depth and extending the application of the QuEChERS method to the analysis of pesticides in soils, as well as to study possible matrix effects, in this fourth work the application of QuEChERS methodology for the extraction of a group of eleven OPPs (*i.e.* ethoprosfos, dimethoate, diazinon, malaoxon, chlorpyrifos-methyl, fenitrothion, malathion, chlorpyrifos, fenamiphos and phosmet) and one thiadiazine pesticide (buprofezin) in three types of soils (forestal, ornamental and agricultural) with fairly different physicochemical properties was investigated. TPP was used as IS. The optimized procedure consisted in the extraction of 10 g of soil with 20 mL ACN, 4 g of MgSO₄ monohydrated, 1 g of NaCl, 1 g of sodium citrate tribasic dihydrate and 0.5 g of sodium hydrogencitrate sesquihydrate. Then, a dSPE of the supernatant was carried out with 1.5 g of MgSO₄ monohydrated and 0.250 g of PSA. The method was validated through linearity, recovery, precision and accuracy studies, also carrying out a matrix-matched calibration for the three soils due to the existence of a strong matrix effect. Acceptable absolute recovery values were obtained (between 45 and 96%) for all the pesticides and soils, except for malathion and malaoxon in forestal and ornamental soils from which they could not be quantitatively extracted, while LODs of the whole method ranged between 0.481 and 7.78 ng/g. The method was finally applied for the determination of chlorpyrifos in a treated soil for potatoes cultivation. Confirmation of these samples was accomplished by GC-MS.

IV.5.- IONIC LIQUID-DISPERSIVE LIQUID-LIQUID MICROEXTRACTION FOR THE SIMULTANEOUS DETERMINATION OF PESTICIDES AND METABOLITES IN SOILS USING HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY AND FLUORESCENCE DETECTION.

Fluorescence detection in HPLC is one of the most selective and sensitive detection systems but its application in this field has been fundamentally limited by the fact that very few pesticides are fluorescent. In this sense, and regarding pesticide analysis by HPLC with direct fluorescence detection, it has only been

applied to a reduced number of families (coumarines, benzimidazoles, some carbamates, etc.). Concerning soil analysis, only a small number of studies have been carried out (HALKO ET AL., 2006; FU ET AL., 2009; WU ET AL., 2009a).

Up to now, DLLME has been barely applied for organic analyte extraction from soils (XIONG AND HU, 2008; FU ET AL., 2009; HU ET AL., 2009b; WU ET AL., 2009a, 2009b). Among these works and, to the best of our knowledge, pesticide extraction has only been carried out in four occasions (XIONG AND HU, 2008; FU ET AL., 2009; WU ET AL., 2009a, 2009b), using in all cases a step by step approach to optimize DLLME parameters. In the work of Xiong and Hu (2008), for example, a group of six pesticides (malathion, chlorpyrifos, buprofezin, triazophos, carbosulfan and pyridaben) were extracted from only one type of soil (also from waters and beverages), while in the work of Fu et al. (2009) only carbaryl and triazophos were determined in three of them. In both works, carbon tetrachloride and MeOH were used as extraction and dispersion solvent, respectively, after a previous extraction of the soils. In the first case, water was used (which was later submitted to the DLLME procedure) while in the second, MeOH was selected (which was afterwards used as dispersion solvent). Another example is the work of Wu et al. (2009a), who used a mixture of acetone and NaHCO₃ solution to extract four sulfonylurea herbicides from one type of soil and then, after a suitable clean-up of the extract with C₁₈-dSPE, chlorobenzene was added as extraction solvent (acetone acted as dispersive solvent). Finally, in the last of these works, Wu et al. (2009b), extracted carbendazim and thiabendazole from two soil samples with a HCl solution which, after pH adjustment, was extracted using chloroform as extractant and tetrahydrofuran as dispersant.

Due to the good extraction capability that ILs have for many organic analytes and being an interesting alternative to conventional extraction solvents, they have been successfully used as extractants for LPME techniques and, specifically, in DLLME they have received growing attention in the last years (PINTO ET AL., 2010; REZAAE ET AL., 2010). However, the number of different ILs assayed for the DLLME of organic analytes is still relatively low.

One of the best known and studied families of ILs are the 1,3-dialkylimidazolium salts. The reason why these salts have a low melting point is not still well-known; however the asymmetry of the cation is believed to play a

major role (LARSEN ET AL., 2000) due to inefficient packing effects. In DLLME, the use of the aforementioned family of ILs is relatively common, specially the non-symmetrical 1-alkyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphates ([RMIm][PF₆]). In this sense, the commercially available 1-hexyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate ([HMIm][PF₆]) IL is the most employed (ZHOU ET AL., 2008a; LIU ET AL., 2009b; MAO ET AL., 2009; WANG ET AL., 2010; GAO ET AL., 2010), followed by 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate ([BMIm][PF₆]) (FAN ET AL., 2008, 2009; CRUZ-VERA ET AL., 2009; BERTON ET AL., 2010; HUANG ET AL., 2011).

In the basis of the latter assumption regarding structure and melting point, 1,3-dialkylimidazolium salts with symmetrical substituents were at first supposed to be poor ILs (DZYUBA AND BARTSCH, 2001). Nevertheless, and surprisingly, 1,3-dialkylimidazolium hexafluorophosphates with symmetrical substituents ranging from dimethyl to dodecyl are found to be ILs (DZYUBA AND BARTSCH, 2001). Concerning their use in DLLME, only 1,3-dibutylimidazolium hexafluorophosphate ([BBIm][PF₆]) (HE ET AL., 2010) has been used for the extraction of four OPPs from water and pear extracts. The synthesis of ILs with different properties and extraction capacities, as well as their application for the extraction of wide variety of analytes from complex matrices, is a desirable field to be expanded.

In this fifth section, an IL-DLLME procedure was developed for the extraction of a group of pesticides (carbendazim/benomyl, thiabendazole, fuberidazole, carbaryl and triazophos) and some of their key metabolites in soils (2-aminobenzimidazole, metabolite of carbendazim and 1-naphthol, metabolite of carbaryl) from aqueous soil extracts, using HPLC with FD. Analytes were previously extracted from soils with different physicochemical properties (forestal, ornamental, garden and lapilli soils) by UAE with MeOH. The IL [HMIm][PF₆] and MeOH were used as extraction and dispersion solvent, respectively, for the DLLME procedure. Factors affecting IL-DLLME (sample pH, IL amount, volume of dispersion solvent and sodium chloride percentage) were optimized by means of an experimental design, obtaining the most favorable results when using 117.5 mg of IL and 418 µL of MeOH to extract the compounds from the aqueous soil extracts at pH 5.20 containing 30% (w/v) NaCl. Calibration of the UAE-IL-DLLME-HPLC-FD method was carried out for every type of soil and accuracy and precision studies were developed at two levels of concentration, finding that no significant

differences existed between the real and spiked concentrations (Student's *t* test). LODs achieved were in the 0.02-27.1 ng/g range.

The second part of the work aimed with the performance of the symmetrical dialkyl-substituted IL, 1,3-dipentylimidazolium hexafluorophosphate ([PPIIm][PF₆]), which was synthesized, purified and characterized in our laboratories, as extraction solvent for IL-DLLME, since the number of alternative ILs available for this purpose is very low. Calibration, precision and accuracy studies with [PPIIm][PF₆] were carried out in two of the soils studied (forestal and garden), obtaining a good linear range and a good performance of the method, being this accurate and repeatable. LODs were in the range 0.02-60.5 ng/g.

A comparison of the performance between the common [HMIIm][PF₆] IL and [PPIIm][PF₆] was developed, comparing the whole method LODs for two soils with different physicochemical properties. Results indicate that the performance of both ILs is comparable for all analytes, except for 2-aminobenzimidazole (metabolite of carbendazim), for which LOD was slightly lower with [HMIIm][PF₆], and for triazophos for which, in contrast, LOD was slightly lower with [PPIIm][PF₆].

According to the good results obtained in the present study, future work might be developed to study the application of [PPIIm][PF₆] for the extraction of different families of pesticides, their metabolites, or even different types of compounds. Besides, it would also be interesting to assess its performance in different matrices.

IV.6.- HOLLOW-FIBER LIQUID-PHASE MICROEXTRACTION FOR THE DETERMINATION OF PESTICIDES AND METABOLITES IN SOILS AND WATER SAMPLES USING HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY AND FLUORESCENCE DETECTION

In the last decade, and particularly in the last five years, HF-LPME has been employed for the extraction of different types of analytes in a wide range of matrices, especially waters of different natures (PINTO ET AL., 2010). Regarding soil analysis, HF-LPME applications are still very scarce considering the age of the technique. In this sense, concerning organic compounds, HF-LPME has been used to extract polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) (KING ET AL., 2002; JIANG ET AL., 2005), as well as polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) (XIAO ET AL., 2007),

polychlorinated biphenyls (BASHEER ET AL., 2005) and chlorophenols (CHUNG AND LEE, 2008). As regards pesticides, twelve organochlorine pesticides (OCPs) (BASHEER ET AL., 2005), a group of eight multiclass (HOU AND LEE, 2004), seven multiclass (HOU ET AL., 2003), six organosulfur pesticides (XIONG AND HU, 2008) and vinclozin (LAMBROPOULOU AND ALBANIS, 2004) have been analyzed in soils using HF-LPME. In two of these works, aqueous (HOU ET AL., 2003) or aquo-organic (HOU AND LEE, 2004) slurries of the soils were employed to carry out HF-LPME, a fact that did not allow the achievement of extremely low LODs. In the others, a previous extraction of the analytes was carried out. In this sense, microwave-assisted extraction (MASE) (BASHEER ET AL., 2005) and UAE (XIONG AND HU, 2008) with water or UAE with MeOH/ACN, followed by evaporation and reconstitution in water (LAMBROPOULOU AND ALBANIS, 2004) were performed. In four of these works toluene was used to impregnate a HF of 1.3 cm (HOU ET AL., 2003; HOU AND LEE, 2004; LAMBROPOULOU AND ALBANIS, 2004; BASHEER ET AL., 2005), and only in one case *o*-xylene was used with a fiber of 1.0 cm (XIONG AND HU, 2008). All these works, which have been developed for volatile pesticides, have employed GC as separation technique and in none of the referenced works the simultaneous extraction of pesticides and metabolites has been proposed.

In this sixth section, a new and simple method has been developed for the determination in soils (forestal and lapilli) of the same group of analytes as in the previous section. UAE was performed in the same way, followed by evaporation and reconstitution in water. Then, extraction and preconcentration of the analytes was accomplished by two-phase HF-LPME using 1-octanol as extraction solvent. Parameters that affect the extraction efficiency in HF-LPME (organic solvent, pH of the sample, extraction time, stirring speed, temperature and ionic strength) were deeply investigated. Optimum HF-LPME conditions involved the use of a 2.0 cm polypropylene fiber filled with 1-octanol to extract 10 mL of an aqueous soil extract at pH 9.0 containing 20% (w/v) of NaCl for 30 minutes at 1440 rpm. Separation and quantification was achieved by HPLC-FD. The proposed methodology provided good calibration, precision and accuracy results for two soils of different physicochemical properties. LODs were in the range 0.001-6.94 ng/g.

Further validation was accomplished applying the developed HF-LPME methodology to three different water samples (Milli-Q, mineral and run-off). Also in this case, calibration, precision and accuracy demonstrated the utility of the

method. LODs were in the range 0.2 ng/L-0.05 µg/L, well below EU's MRLs for drinking water (0.10 µg/L), except for 2-aminobenzimidazole and carbendazim/benomyl (0.39-0.57 µg/L), which are the two target analytes with the smallest K_{ow} . Even though, the proposed HF-LPME procedure, which is very simple and quick, was found very appropriate for the extraction of these pesticides from soil samples as well as for the extraction of most of these analytes from different water samples.

CHAPTER V. GENERAL CONCLUSIONS

From the experimental work, the results and the specific conclusions of each section developed in the present PhD Thesis, the following general conclusions can be drawn:

- Several analytical methodologies were developed for the analysis of different groups of pesticides and some of their metabolites, of different chemical families (such as OPPs, benzimidazoles, triazines, carbamates, etc.) in soils with dissimilar physicochemical properties and origin (forestal, ornamental, agricultural, garden and lapilli), as well as waters of different nature (Milli-Q, mineral and run-off).
- Different separation techniques were successfully applied, such as CE, GC, HPLC and nano-LC, also studying different on-line preconcentration procedures. In this sense, electrokinetic injection was used in CE and on-column focusing as well as a 2D system with the employment of a micro-precolumn were used in nano-LC, achieving an important sensitivity enhancement for both techniques.
- Diverse extraction and off-line preconcentration techniques, like UAE, the QuEChERS method, SPE, DLLME and HF-LPME, were employed for pesticide and some of their metabolites extraction from soils. On the other hand, conventional and dSPE and HF-LPME was used to determine these analytes in waters.
- The utility and effectiveness of new materials such as MWCNTs as new stationary phases for SPE, and ILs as new extraction solvents in DLLME, was demonstrated. In particular, the IL [PPIIm][PF₆] was synthesized and applied for the extraction of pesticides and metabolites, being this the first time that it

was used with this purpose.

- The combination of on-line and off-line preconcentration techniques provided in most cases LODs suitable for the analysis of pesticide residues in waters, below the EU's MRLs (0.10 µg/L), as well as in soils at the low ng/g level.
- The developed methodologies were validated through calibration, repeatability, recovery and accuracy studies in different types of soils and waters, showing satisfactory results in all cases from an analytical point of view.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

A

A HISTORY OF CROP PROTECTION AND PEST CONTROL IN OUR SOCIETY, CROPLIFE, CANADA (<http://www.croplife.ca>, consultada en mayo de 2012).

ABDOLMOHAMMAD-ZADEH, H; SADEGHI, GH (2009). A novel microextraction technique based on 1-hexylpyridinium hexafluorophosphate ionic liquid for the preconcentration of zinc in water and milk samples. *Anal. Chim. Acta*, 649:211.

AGUILERA-HERRADOR, E; LUCENA, R; CÁRDENAS, S; VALCÁRCEL, M (2010). The roles of ionic liquids in sorptive microextraction techniques. *Trends Anal. Chem.*, 29:6.

AGUILERA-LUIZ, MM; MARTÍNEZ VIDAL, JL; ROMERO-GONZÁLEZ, R; GARRIDO FRENICH, A (2008). Multi-residue determination of veterinary drugs in milk by ultra-high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1205:10.

AL-DEGS, YS; AL-GHOUTI, MA (2008). Preconcentration and determination of high leachable pesticides residues in water using solid-phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography. *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 88:487.

AL-DEGS, YS; AL-GHOUTI, MA; EL-SHEIKH, AH (2009). Simultaneous determination of pesticides at trace levels in water using multiwalled carbon nanotubes as solid-phase extractant and multivariate calibration. *J. Hazard. Mater.*, 169:128.

ANASTASSIADES, M; LEHOTAY, SJ; ŠTAJNBAHER, D; SCHENK, FJ (2003). Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. *J. AOAC Int.*, 86:412.

ANASTASSIADES, M; SCHERBAUM, E; TASDELEN, B; ŠTAJNBAHER, D (2007). Recent developments in QuEChERS methodology for pesticide multiresidue analysis. En *Pesticide Chemistry: Crop Protection, Public Health, Environmental Safety*. Ohkawa, H; Miyagawa, H; Lee, PW (Eds.). Wiley-VCH, Weinheim, Alemania.

ANDREU, V; PICÓ, Y (2004). Determination of pesticides and their degradation products in soil: critical review and comparison of methods. *Trends Anal. Chem.*, 23:772.

ANIRUDDHA, P; ANUNAY, S (2006). Optical absorption and fluorescence studies on imidazolium ionic liquids comprising the bis(trifluoromethane-sulphonyl)imide anion. *J. Chem. Sci.*, 118:335.

ANIRUDDHA, P; MANDAL, PK; SAMANTA, A (2005). How transparent are the imidazolium ionic liquids? A case study with 1-methyl-3-butylimidazolium hexafluorophosphate, [BMIm][PF₆]. *Chem. Phys. Lett.*, 402:375.

ARCE, A; EARLE, MJ; KATDARE, SP; RODRÍGUEZ, H; SEDDON, KR (2008). Application of mutually immiscible ionic liquids to the separation of aromatic and aliphatic hydrocarbons by liquid extraction: a preliminary approach. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 10:2538.

ARIAS-ESTÉVEZ, M; LÓPEZ-PERIAGO, E; MARTÍNEZ-CARBALLO, E; SIMAL-GÁNDARA, J; MEJUTO, JC; GARCÍA-RÍO, L (2008). The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources. *Agric. Ecosyst. Environ.*, 123:247.

ARMENTA, S; LENDL, B (2010). Capillary liquid chromatography with off-line mid-IR and Raman micro-spectroscopic detection: analysis of chlorinated pesticides at ppb levels. *Anal. Bioanal. Chem.*, 397:297.

ARMSTRONG, DW; HE, L; LIU, YS (1999). Examination of ionic liquids and their interaction with molecules, when used as stationary phases in gas chromatography. *Anal. Chem.*, 71:3873.

ARMSTRONG, DW; ZHANG, LK; HE, L; GROSS, ML (2001). Ionic liquids as matrixes for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 73:3679.

ASPERGER, A; EFER, J; KOAL, T; ENGEWALD, W (2002). Trace determination of priority pesticides in water by means of high-speed on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry using turbulent-flow chromatography columns for enrichment and a short monolithic column for fast liquid chromatographic separation. *J. Chromatogr. A*, 960:109.

B

BAI, H; ZHOU, Q; XIE, G; XIAO, J (2009). Enrichment and sensitive determination of dichlorodiphenyltrichloroethane and its metabolites with temperature controlled ionic liquid dispersive liquid phase microextraction prior to high performance liquid phase chromatography. *Anal. Chim. Acta*, 651:64.

BANERJEE, K; PATIL, SH; DASGUPTA, S;

OULKAR, DP; PATIL, SB; SAVANT, R; ADSULE, PG (2008). Optimization of separation and detection conditions for the multiresidue analysis of pesticides in grapes by comprehensive two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1190:305.

BARAHONA, F; GJELSTAD, A; PEDERSEN-BJERGAARD, S; RASMUSSEN, KE (2010). Hollow fiber-liquid-phase microextraction of fungicides from orange juices. *J. Chromatogr. A*, 1217:1989.

BASHEER, C; ALNEDHARY, AA; MADHAVA RAO, BS; VALLIYAREETIL, S; LEE, HK (2006). Development and application of porous membrane-protected carbon nanotube micro-solid-phase extraction combined with gas chromatography/mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 78:2853.

BASHEER, C; ALNEDHARY, AA; RAO, BSM; LEE, HK (2009). Determination of carbamate pesticides using micro-solid-phase extraction combined with high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1216:211.

BASHEER, C; OBBARD, JP; LEE, HK (2005). Analysis of persistent organic pollutants in marine sediments using a novel microwave assisted solvent extraction and liquid-phase microextraction technique. *J. Chromatogr. A*, 1068:221.

BEALE, DJ; KASERZON, SL; PORTER, NA; RODDICK, FA; CARPENTER, PD (2010). Detection of s-triazine pesticides in natural waters by modified large-volume direct injection HPLC. *Talanta*, 82:668.

BEDENDO, GC; CARASEK, E (2010). Simultaneous liquid-liquid microextraction and polypropylene microporous membrane solid-phase extraction of organochlorine pesticides in water, tomato and strawberry

- samples. *J. Chromatogr. A*, 1217:7.
- BEDENDO, GC; JARDIM, ICSF; CARASEK, E (2010). A simple hollow fiber renewal liquid membrane extraction method for analysis of sulfonamides in honey samples with determination by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1217:6449.
- BELMONTE VEGA, A; GARRIDO FRENICH, A; MARTÍNEZ VIDAL, JL (2005). Monitoring of pesticides in agricultural water and soil samples from Andalusia by liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 538:117.
- BELTRÁN, A; BORRUL, F; MARCÉ, RM; CORMACK, PAG (2010). Molecularly-imprinted polymers: useful sorbents for selective extractions. *Trends Anal. Chem.*, 29:1363.
- BERTON, P; MARTINIS, EM; WUILLOUD, RG (2010). Development of an on-line temperature-assisted ionic liquid dispersive microextraction system for sensitive determination of vanadium in environmental and biological samples. *J. Hazard. Mater.*, 176:721.
- BETHUNE, DS; KLANG, CH; DE VRIES, MS; GORMAN, G; SAVOY, R; VASQUEZ, J; BEYERS, R (1993). Cobalt-catalysed growth of carbon nanotubes with single-atomic-layer walls. *Nature*, 363:605.
- BICCHI, C; BRUNELLI, C; GALLI, M; SIRONI, A (2001). Conventional inner diameter short capillary columns: an approach to speeding up gas chromatographic analysis of medium complexity samples. *J. Chromatogr. A*, 931:129.
- BIESAGA, M; PYRZYNSKA, K (2006). The evaluation of carbon nanotubes as a sorbent for dicamba herbicide. *J. Sep. Sci.*, 29:2241.
- BLASIOLI, S; BRASCHI, I; GESSA, CE (2011). The fate of herbicides in soils. En: *Herbicides and environment*, Ed. InTech, Croatia.
- BORISSOVA, M; PALK, K; KOEL, M (2008). Micellar electrophoresis using ionic liquids. *J. Chromatogr. A*, 1183:192.
- BOSSI, R; VEJRUP, KV; MOGENSEN, BB; ASMAN, WAH (2002). Analysis of polar pesticides in rainwater in Denmark by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 957:27.
- BOUZIGE, M; PICHON, V (1998). Immunoextraction of pesticides at the trace level in environmental matrices. *Analisis*, 26:M112.
- BRUN, GL; MACDONALD, RM (1980). Determination of aminocarb in water by high performance liquid chromatography. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 24:886.
- BUONASERA, K; D'ORAZIO, G; FANALI, S; DUGO, P; MONDELLO, L (2009). Separation of organophosphorus pesticides by using nano-liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1216:3970.
- BURGI, DS; BRADEN, C (2008). Online sample preconcentration for capillary electrophoresis. En: Landers, JP (2008). *Capillary and microchip electrophoresis and associated microtechniques*. Taylor & Francis Group. Florida.
- BUSHWAY, RJ; HURST, HL; KUGABALASOORIAN, J; PERKINS, LB (1991). Determination of carbendazim in blueberries by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 587:321.
- BUZZEO, MC; EVANS, RG; COMPTON, RG

(2004). Non-haloaluminatate room-temperature ionic liquids in electrochemistry-A review. *ChemPhysChem.*, 5:1106.

BUZZEO, MC; HARDACRE, C; COMPTON, RG (2004). Use of room temperature ionic liquids in gas sensor design. *Anal. Chem.*, 76:4583.

C

CABALLO-LÓPEZ, A; LUQUE DE CASTRO, MD (2003). Continuous ultrasound-assisted extraction coupled to on line filtration-solid-phase extraction-column liquid chromatography-post column derivatisation-fluorescence detection for the determination of N-methylcarbamates in soil and food. *J. Chromatogr. A*, 998:51.

CAPPIELLO, A; FAMIGLINI, G; MANGANI, F; PALMA, P (2002a). A simple approach for coupling liquid chromatography and electron ionization mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 13:265.

CAPPIELLO, A; FAMIGLINI, G; MANGANI, F; PALMA, P; SIVIERO, A (2003). Nano-high-performance liquid chromatography-electron ionization mass spectrometry approach for environmental analysis. *Anal. Chim. Acta*, 493:125.

CAPPIELLO, A; FAMIGLINI, G; PALMA, P; MANGANI, F (2002b). Trace level determination of organophosphorus pesticides in water with the new direct-electron ionization LC/MS interface. *Anal. Chem.*, 74:3547.

CARABIAS-MARTÍNEZ, R; RODRÍGUEZ-GONZALO, E; DOMÍNGUEZ-ÁLVAREZ, J; HERNÁNDEZ-MÉNDEZ, J (1997). Capillary zone electrophoresis in nonaqueous solvents in the presence of ionic additives. *Anal. Chem.*, 69:4437.

CARABIAS-MARTÍNEZ, R; RODRÍGUEZ-GONZALO, E; DOMÍNGUEZ-ÁLVAREZ, J; HERNÁNDEZ-MÉNDEZ, J (1999). Cloud point extraction as a preconcentration step prior to capillary electrophoresis. *Anal. Chem.*, 71:2468.

CARABIAS-MARTÍNEZ, R; RODRÍGUEZ-GONZALO, E; DOMÍNGUEZ-ÁLVAREZ, J; HERNÁNDEZ-MÉNDEZ, J (2000). Determination of triazine herbicides in natural waters by solid-phase extraction and non-aqueous capillary zone electrophoresis. *J. Chromatogr. A*, 869:451.

CARABIAS-MARTÍNEZ, R; RODRÍGUEZ-GONZALO, E; DOMÍNGUEZ-ÁLVAREZ, J; HERNÁNDEZ-MÉNDEZ, J (2002). Comparative study of separation and determination of triazines by micellar electrokinetic capillary chromatography and nonaqueous capillary electrophoresis: Application to residue analysis in natural waters. *Electrophoresis*, 23:494.

CARABIAS-MARTÍNEZ, R; RODRÍGUEZ-GONZALO, E; HERNÁNDEZ-MÉNDEZ, J; MIRANDA-CRUZ, E; DOMÍNGUEZ-ÁLVAREZ, J (2006a). Ion-pair association and acid-base equilibria in nonaqueous capillary electrophoresis of weakly basic compounds. *Electrophoresis*, 27:423.

CARABIAS-MARTÍNEZ, R; RODRÍGUEZ-GONZALO, E; MIRANDA-CRUZ, E; DOMÍNGUEZ-ÁLVAREZ, J; HERNÁNDEZ-MÉNDEZ, J (2006b). Comparison of a non-aqueous capillary electrophoresis method with high performance liquid chromatography for the determination of herbicides and metabolites in water samples. *J. Chromatogr. A*, 1122:194.

CARABIAS-MARTÍNEZ, R; RODRÍGUEZ-GONZALO, E; MIRANDA-CRUZ, E; DOMÍNGUEZ-

- ÁLVAREZ, J; HERNÁNDEZ-MÉNDEZ, J (2007). Sensitive determination of herbicides in food samples by nonaqueous CE using pressurized liquid extraction. *Electrophoresis*, 28:3606.
- CARLETTO, JS; LUCIANO, RM; BEDENDO, GC; CARASEK, E (2009). Simple hollow fiber renewal liquid membrane extraction method for pre-concentration of Cd(II) in environmental samples and detection by flame atomic absorption spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 638:45.
- CARMICHAEL, AJ; SEDDON, KR (2000). Polarity study of some 1-alkyl-3-methylimidazolium ambient-temperature ionic liquids with the solvatochromic dye, Nile Red. *J. Phys. Org. Chem.*, 13:591.
- CARSON, R (1962). Silent Spring. Houghton Mifflin, Boston.
- CARVALHO, FP (2006). Agriculture, pesticides, food security and food safety. *Environ. Sci. Policy*, 9:685.
- CHÁFER-PERICÁS, C; HERRÁEZ-HERNÁNDEZ, R; CAMPÍNS-FALCÓ, P (2006). On-fibre solid-phase microextraction coupled to conventional liquid chromatography versus in-tube solid-phase microextraction coupled to capillary liquid chromatography for the screening analysis of triazines in water samples. *J. Chromatogr. A*, 1125:159.
- CHÁFER-PERICÁS, C; HERRÁEZ-HERNÁNDEZ, R; CAMPÍNS-FALCÓ, P (2007). In-tube solid-phase microextraction-capillary liquid chromatography as a solution for the screening analysis of organophosphorus pesticides in untreated environmental water samples. *J. Chromatogr. A*, 1141:10.
- CHAMBERS, SD; SVEC, F; FRECHET, JMJ (2011). Incorporation of carbon nanotubes in porous polymer monolithic capillary columns to enhance the chromatographic separation of small molecules. *J. Chromatogr. A*, 1218:2546.
- CHEN, L; LI, XS; WANG, ZQ; PAN, CP; JIN, RC (2009). Residue dynamics of procymidone in leeks and soil in greenhouses by smoke generator application. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 73:73.
- CHEN, YL; LU, WJ; CHEN, XG; TENG, M (2012). Review of recent developments of on-line sample stacking techniques and their application in capillary electrophoresis. *Cent. Eur. J. Chem.*, 10:611.
- CHIEN, RL; BURGI, DS (1991). Field amplified sample injection in high-performance capillary electrophoresis. *J. Chromatogr.*, 559:141.
- CHIEN, RL; BURGI, DS (1992). Sample stacking of an extremely large injection volume in high-performance capillary electrophoresis. *Anal. Chem.*, 64:1046.
- CHOCHOLOUS, P; SATÍNSKÝ, D; SLADKOVSKÝ, R; POSPÍSOVÁ, M; SOLICH, P (2008). Determination of pesticides fenoxycarb and permethrin by sequential injection chromatography using miniaturized monolithic column. *Talanta*, 77:566.
- CHUNG, LW; LEE, MR (2008). Evaluation of liquid-phase microextraction conditions for determination of chlorophenols in environmental samples using gas chromatography-mass spectrometry without derivatization. *Talanta*, 76:154.
- COLY, A; AARON, JJ (1998). Fluorimetric analysis of pesticides: methods, recent developments and applications. *Talanta*, 46:815.
- COSCOLLA, R (1993). *Residuos de plaguicidas*

en alimentos vegetales. Ediciones Mundi-Prensa. España.

CRUZ-VERA, M; LUCENA, R; CÁRDENAS, S; VALCÁRCEL, M (2008). Combined use of carbon nanotubes and ionic liquid to improve the determination of antidepressants in urine samples by liquid chromatography. *Anal. Bioanal. Chem.*, 391:1139.

CRUZ-VERA, M; LUCENA, R; CÁRDENAS, S; VALCÁRCEL, M (2009). One-step in-syringe ionic liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction. *J. Chromatogr. A*, 1216:6459.

CUNHA, SC; LEHOTAY, SJ; MAŠTOVSKA, K; FERNANDES, JO; BEATRIZ, M; OLIVEIRA, PP (2007). Evaluation of the QuEChERS sample preparation approach for the analysis of pesticide residues in olives. *J. Sep. Sci.*, 30:620.

CURINI, R; GENTILI, A; MARCHESE, S; MARINO, A; PERRET, D (2000). Solid-phase extraction followed by high-performance liquid chromatography-ionspray interface-mass spectrometry for monitoring of herbicides in environmental water. *J. Chromatogr. A*, 874:187.

D

D'ASCENZO, G; GENTILI, A; MARCHESE, S; PERRET, D (1998). Determination of arylphenoxypropionic herbicides in water by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 813:285.

D'ORAZIO, G; FANALI, S (2009). Enantiomeric separation by using nano-liquid chromatography with on-column focusing. *J. Sep. Sci.* 31:2567.

D'ORAZIO, G; ROCCO, A; FANALI, S (2012). Fast-liquid chromatography using columns of

different internal diameters packed with sub-2 μm silica particles. *J. Chromatogr. A*, 1228:213.

DĄBROWSKI, L; GIERGIELEWICKZ-MOŻAJSKA, H; GÓRSKI, Ł; BIZIUK, M; NAMIEŚNIK, J; JANICKI, B (2002). Determination of environmental pollutants in soil and sediments - Some aspects of sample clean-up and GC analysis. *J. Sep. Sci.*, 25:290.

DALLÜGE, J; VAN RIJN, M; BEENS, J; VREULS, JJ; BRINKMAN, UATH (2002a). Comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometric detection applied to the determination of pesticides in food extracts. *J. Chromatogr. A*, 965:207.

DALLÜGE, J; VREULS, RJJ; VAN IPEREN, DJ; VAN RIJN, M; BRINKMAN, U.A.TH (2002b). Resistively heated gas chromatography coupled to quadrupole mass spectrometry. *J. Sep. Sci.*, 25:608.

DECISIÓN N° 2455/2001/CE DE 20 DE NOVIEMBRE DE 2001 por la que se aprueba la lista de sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas, y por la que se modifica la Directiva 2000/60/CE (*Diario oficial de la UE*, L 331 de 15.12.2001)

DELGADO, JL; HERRANZ, MA; MARTÍN, N; (2007). Nanoestructuras de carbono: un nuevo desafío científico. *An. Quím.*, 103:5.

DENG, Y; DENG, C; YANG, D; WANG, C; FU, S; ZHANG, X (2005). Preparation, characterization and application of magnetic silica nanoparticle functionalized multi-walled carbon nanotubes. *Chem. Commun.*, 44:5548.

DESTY, DH (1965). *Advances in chromatography*, Marcel Dekker, Nueva York.

DÍAZ-CRUZ, MS; BARCELÓ, D (2006). Highly

selective sample preparation and gas chromatographic-mass spectrometric analysis of chlorpyrifos, diazinon and their major metabolites in sludge and sludge-fertilized agricultural soils. *J. Chromatogr. A*, 1132:21.

DIRECTIVA 2000/60/CE DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO DE 23 DE OCTUBRE DE 2000 por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas (*Diario oficial de la UE*, L 327/1 de 22.12.2000).

DIRECTIVA 98/83/CE DEL CONSEJO DE 3 DE NOVIEMBRE DE 1998, relativa a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano (*Diario oficial de la UE*, L 330/32 de 5.12.98).

DÖMÖTÖROVÁ, M; MATISOVÁ, E (2008). Fast gas chromatography for pesticide residues analysis. *J. Chromatogr. A*, 1207:1.

DONATO, P; CACCIOLA, F; MONDELLO, L; DUGO, P (2011). Comprehensive chromatographic separations in proteomics. *J. Chromatogr. A*, 1218:8777.

DONG, F; LIU, X; CHENG, L; CHEN, W; LI, J; QIN, D; ZHENG, Y (2009). Determination of metaflumizone residues in cabbage and soil using ultra-performance liquid chromatography/ESI-MS/MS. *J. Sep. Sci.*, 32:3692.

DROŹDŹYŃSKI, D; KOWALSKA, J (2009). Rapid analysis of organic farming insecticides in soil and produce using ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.*, 394:2241.

DU, D; WANG, M; ZHANG, J; CAI, J; TU, H; ZHANG, A (2008). Application of multiwalled carbon nanotubes for solid-phase extraction of organophosphate pesticide. *Electrochem. Commun.*, 10:85.

DUAN, AH; XIE, SM; YUAN, LM (2011). Nanoparticles as stationary and pseudo stationary phases in chromatographic and electrochromatographic separations. *Trends Anal. Chem.*, 30:484.

DZYUBA, SV; BARTSCH, RA (2001). New room-temperature ionic liquids with C₂-symmetrical imidazolium cations. *Chem. Commun.*, 16:1466.

E

EARLE, MJ; GORDON, CM; PLECHKOVA, NV; SEDDON, KR; WELTON, T (2007). Decolorization of ionic liquids for spectroscopy. *Anal. Chem.*, 79:758.

EISERT, R; LEVSEN, K (1995). Determination of pesticides in aqueous samples by solid-phase microextraction in-line coupled to gas chromatography-mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 6:1119.

EL-SHEIKH, AH; INSISI, AA; SWEILEH, JA (2007). Effect of oxidation and dimensions of multi-walled carbon nanotubes on solid phase extraction and enrichment of some pesticides from environmental waters prior to their simultaneous determination by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1164:25.

EL-SHEIKH, AH; SWEILEH, JA; AL-DEGS, YS; INSISI, AA; AL-RABADY, N (2008). Critical evaluation and comparison of enrichment efficiency of multi-walled carbon nanotubes, C18 silica and activated carbon towards some pesticides from environmental waters. *Talanta*, 74:1675.

ELLIOTT, JA; CESNA, AJ; BEST, KB; NICHOLAICHUK, W; TOLLEFSON, LC (2000). Leaching rates and preferential flow of selected herbicides through tilled and untilled soil. *J. Environ. Qual.*, 29:1650.

ERNI, F; FREI, RW (1978). Two-dimensional column liquid chromatographic technique for resolution of complex mixtures. *J. Chromatogr.*, 149:561.

F

FANG, GZ; HE, JX; WANG, S (2006). Multiwalled carbon nanotubes as sorbent for on-line coupling of solid-phase extraction to high-performance liquid chromatography for simultaneous determination of 10 sulfonamides in eggs and pork. *J. Chromatogr. A*, 1127:12.

FAMIGLINI, G; PALMA, P; PIERINI, E; TRUFELLI, H; CAPIELLO, A (2008). Organochlorine pesticides by LC-MS. *Anal. Chem.*, 80:3445.

FAMIGLINI, G; PALMA, P; SIVIERO, A; REZAI, MA; CAPIELLO, A (2005). Determination of endocrine disrupting compounds in marine water by nanoliquid chromatography/direct-electron ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 77:7654.

FAN, YC; CHEN, ML; SHEN-TU, C; ZHU, Y (2009). An ionic liquid for dispersive liquid-liquid microextraction of phenols. *J. Anal. Chem.*, 64:1017.

FAN, YC; HU, ZL; CHEN, ML; TU, CS; ZHU, Y (2008). Ionic liquid based dispersive liquid-liquid microextraction of aromatic amines in water samples. *Chin. Chem. Lett.*, 19:985.

FANALI, S; ATURKI, K; D'ORAZIO, G; ROCCO, A (2007). Separation of basic compounds of pharmaceutical interest by using nano-liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1150:252.

FANALI, S; D'ORAZIO, G; ROCCO, A (2006). Use of tert-butylbenzoylated tartardiamide chiral stationary phase for the enantiomeric

resolution of acidic compounds by nano-liquid chromatography. *J. Sep. Sci.*, 29:1423.

FELICE, LJ; CHALERMCHAIKIT, T; MURPHY, MJ (1991). Multicomponent determination of 4-hydroxycoumarin anticoagulant rodenticides in blood serum by liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Anal. Toxicol.*, 15:126.

FLAHAUT, E; LAURENT, C; PEIGNEY, A (2005). Catalytic CVD synthesis of double and triple-walled carbon nanotubes by the control of the catalyst preparation. *Carbon*, 43:375.

FOOTPRINT-IUPAC, BASE DE DATOS DE LAS PROPIEDADES DE LOS PLAGUICIDAS, RECOPIADA POR LA UNIVERSIDAD DE HERTFORDSHIRE COMO PARTE DEL PROYECTO FOOTPRINT, FINANCIADO POR LA UE (FP6-SSP-022704) (<http://www.eu-footprint.org/ppdb.html>, consultada en mayo de 2012).

FRANCOIS, Y; VARENNE, A; JUILLERAT, E; VILLEMIN, D; GAREIL, P (2007). Nonaqueous capillary electrophoretic behavior of 2-aryl propionic acids in the presence of an achiral ionic liquid: a chemometric approach. *J. Chromatogr. A*, 1138:268.

FREIRE, MG; SANTOS, LMNBF; FERNANDES, AM; COUTINHO, JAP; MARRUCHO, IM (2007). An overview of the mutual solubilities of water-imidazolium-based ionic liquids system. *Fluid Phase Equilib.*, 261:449.

FRTZ, JS (1999). Analytical solid-phase extraction. Wiley-VCH. Nueva York.

FU, L; LIU, X; HU, J; ZHAO, X; WANG, H; HUANG, C; WANG, X (2009). Determination of two pesticides in soils by dispersive liquid-liquid microextraction combined with LC-fluorescence detection. *Chromatographia*, 70:1697.

FUENTES, E; BÁEZ, ME; LABRA, R (2007). Parameters affecting microwave-assisted extraction of organophosphorus pesticides from agricultural soil. *J. Chromatogr. A*, 1169:40.

G

GAO, S; YOU, J; ZHENG, X; WANG, Y; REN, R; ZHANG, R; BAI, Y; ZHANG, H (2010). Determination of phenylurea and triazine herbicides in milk by microwave assisted ionic liquid microextraction high-performance liquid chromatography. *Talanta*, 82:1371.

GARCÍA-PÉREZ, I; VALLEJO, M; GARCÍA, A; LEGIDO-QUIGLEY, C; BARBAS, C (2008). Metabolic fingerprinting with capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A*, 1204:130.

GEISER, L; VEUTHEY, JL (2007). Nonaqueous capillary electrophoresis in pharmaceutical analysis. *Electrophoresis*, 28:45.

GEISER, L; VEUTHEY, JL (2009). Non-aqueous capillary electrophoresis 2005-2008. *Electrophoresis*, 30:36.

GHAREHBAGHI, M; SHEMIRANI, F (2011). Ionic liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction and enhanced spectrophotometric determination of molybdenum (VI) in water and plant leaves samples by FO-LADS. *Food Chem. Toxicol.*, 49:423.

GLOBAL NETWORK FOR INFORMATION AND PROPERTIES ON AGROCHEMICALS (IUPAC) (<http://agrochemicals.iupac.org>, consultada en mayo de 2012)

GONÇALVES, C; CARVALHO, JJ; AZENHA, MA; ALPENDURADA, MF (2006). Optimization of supercritical fluid extraction of pesticide residues in soil by means of central composite

design and analysis by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1110:6.

GUI, W; LIANG, C; GUO, Y; ZHU, G (2010). An improved rapid on-site immunoassay for triazophos in environmental samples. *Anal. Lett.*, 43:487.

GUI, WJ; WANG, ST; GUO, YR; ZHU, GN (2008). Development of a one-step strip for the detection of triazophos residues in environmental samples. *Anal. Biochem.*, 377:202.

GUILLARME, D; SCHAPPLER, J; RUDAZ, S; VEUTHEY, JL (2010). Coupling ultra-high-pressure liquid chromatography with mass spectrometry. *Trends Anal. Chem.*, 29:15.

H

HALKO, R; PADRÓN SANZ, C; SOSA FERRERA, Z; SANTANA RODRÍGUEZ, JJ (2006). Determination of benzimidazole fungicides in soil samples using microwave-assisted micellar extraction and liquid chromatography with fluorescence detection. *J. AOAC Int.*, 89:1403.

HE, L; LUO, X; JIANG, X; QU, L (2010). A new 1,3-dibutylimidazolium hexafluorophosphate ionic liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction to determine organophosphorus pesticides in water and fruit samples by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1217:5013.

HE, L; LUO, X; XIE, H; WANG, C; JIANG, X; LU, K (2009). Ionic liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction followed high-performance liquid chromatography for the determination of organophosphorus pesticides in water sample. *Anal. Chim. Acta*, 655:52.

- HENNION, MC (1999). Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 856:3.
- HERNÁNDEZ-BORGES, J; ATURKI, Z; ROCCO, A; FANALI, S (2007). Recent applications in nanoliquid chromatography. *J. Sep. Sci.*, 30:1589.
- HERNÁNDEZ-BORGES, J; GARCÍA-MONTELONGO, FJ; CIFUENTES, A; RODRÍGUEZ-DELGADO, MA (2005). Analysis of triazolopyrimidine herbicides in soils using field-enhanced sample injection-coelectroosmotic capillary electrophoresis combined with solid-phase extraction. *J. Chromatogr. A*, 1100:236.
- HERRERO, M; IBÁÑEZ, E; CIFUENTES, A; BERNAL, J (2009). Multidimensional chromatography in food analysis. *J. Chromatogr. A*, 1216:7110.
- HO, TS; HALVORSEN, TG; PEDERSEN-BJERGAARD, S; RASMUSSEN, KE (2003). Liquid-phase microextraction of hydrophilic drugs by carrier-mediated transport. *J. Chromatogr. A*, 998:61.
- HOGENDOORN, EA; WESTHUIS, K; DIJKMAN, E; HEUSINKVELD, HAG; CHAMRASKUL, P; BIADUL, P; BAUMANN, RA; CORNELESE, AA; VAN DER LINDEN, MA (2000). Determination of carbendazim in water, soil and sediment samples by RPLC with and without column switching and various spectrometric detection modes. *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 78:67.
- HOOPERBRUGGE, R; MOLINS, C; BAUMANN, RA (1997). Effects of parameters on microwave assisted extraction of triazines from soil: evaluation of an optimisation trajectory. *Anal. Chim. Acta*, 348:247.
- HORVATH, CG; PREISS, BA; LIPSKY, SR (1967). Fast liquid chromatography. Investigation of operating parameters and the separation of nucleotides on pellicular ion exchangers. *Anal. Chem.*, 39:1422.
- HOU, L; LEE, HK (2004). Determination of pesticides in soil by liquid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1038:37.
- HOU, L; SHEN, G; LEE, HK (2003). Automated hollow fiber-protected dynamic liquid-phase microextraction of pesticides for gas chromatography-mass spectrometric analysis. *J. Chromatogr. A*, 985:107.
- HU, CY; XU, YJ; DUO, SW; ZHANG, RF; LI, MS (2009a). Non-covalent functionalization of carbon nanotubes with surfactants and polymers. *J. Chin. Chem. Soc.*, 56:234.
- HU, J; FU, L; ZHAO, X; LIU, X; WANG, H; WANG, X; DAI, L (2009b). Dispersive liquid-liquid microextraction combined with gas chromatography-electron capture detection for the determination of polychlorinated biphenyls in soils. *Anal. Chim. Acta*, 640:100.
- HUANG, KJ; JIN, CX; SONG, SL; WEI, CY; LIU, YM; LI, J (2011). Development of an ionic liquid-based ultrasonic-assisted liquid-liquid microextraction method for sensitive determination of biogenic amines: Application to the analysis of octopamine, tyramine and phenethylamine in beer samples. *J. Chromatogr. B*, 879:579.
- HUANG, KJ; WEI, CY; LIU, WL; XIE, WZ; ZHANG, JF; WANG, W (2009). Ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction combined with high-performance liquid chromatography-fluorescence detection for sensitive determination of biogenic amines in rice wine

samples. *J. Chromatogr. A*, 1216:6636.

HUANG, L; LIN, J; XU, L; CHEN, G (2007). Nonaqueous and aqueous-organic media for the enantiomeric separations of neutral organophosphorus pesticides by CE. *Electrophoresis*, 28:2758.

HUANG, SP; HUANG, SD (2006). Dynamic hollow fiber protected liquid phase microextraction and quantification using gas chromatography combined with electron capture detection of organochlorine pesticides in green tea leaves and ready-to-drink tea. *J. Chromatogr. A*, 1135:6.

HUDELSTON, JG; VISSER, AE; REICHERT, WM; WILLAUER, HD; BROKER, GA; ROGERS, RD (2001). Characterization and comparison of hydrophilic and hydrophobic room temperature ionic liquids incorporating the imidazolium cation. *Green Chem.*, 3:156.

HUERTAS-PÉREZ, JF; DEL OLMO IRUELA, M; GARCÍA-CAMPAÑA, AM; GONZÁLEZ-CASADO, A; SÁNCHEZ-NAVARRO, A (2006). Determination of the herbicide metribuzin and its major conversion products in soil by micellar electrokinetic chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1102:280.

HUMAM, M; BIERI, S; GEISER, L; MUÑOZ, O; VEUTHEY, JL; CHRISTEN, P (2005). Separation of four isomeric tropane alkaloids from *Schizanthus grahamii* by non-aqueous capillary electrophoresis. *Phytochem. Anal.*, 16:349.

I

IIJIMA, S (1991). Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature*, 354:56.

IIJIMA, S; ICHICHASHI, T (1993). Single-shell carbon nanotubes of 1-nm diameter. *Nature*, 363:603.

IKEGAMI, T; TANAKA, N (2004). Monolithic columns for high-efficiency HPLC separations. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 8:527.

ITAK, JA; SELISKER, MY; JOURDAN, SW; FLEEKER, JR; HERZOG, DP (1993). Determination of benomyl (as carbendazim) and carbendazim in water, soil, and fruit juice by a magnetic particle-based immunoassay. *J. Agric. Food Chem.*, 41:2329.

J

JEANNOT, MA; CANTWELL, FF (1996). Solvent microextraction into a single drop. *Anal. Chem.*, 68:2236.

JIA, C; ZHU, X; CHEN, L; HE, M; YU, P; ZHAO, E (2010). Extraction of organophosphorus pesticides in water and juice using ultrasound-assisted emulsification-microextraction. *J. Sep. Sci.*, 33:244.

JIANG, L; GAO, L (2003). Carbon nanotubes-magnetite nanocomposites from solvothermal processes: formation, characterization, and enhanced electrical properties. *Chem. Mater.*, 15:2848.

JIANG, X; BASHEER, C; ZHANG, J; LEE, HK (2005). Dynamic hollow fiber-supported headspace liquid-phase microextraction. *J. Chromatogr. A*, 1087:289.

JOURNET, C; MATSER, WK; BERNIER, P; LAISEAU, L; LEFRANT, S; DENIARD, P; LEE, R; FISCHER, JE (1997). Large-scale production of single-walled carbon nanotubes by the electric-arc technique. *Nature*, 388:756.

K

KARLSSON, KE; NOVOTNY, M (1988). Separation efficiency of slurry-packed liquid chromatography microcolumns with very small inner diameters. *Anal. Chem.* 60:1662.

- KARTSOVA, LA; BESSONOVA, EA (2009). Preconcentration techniques in capillary electrophoresis. *J. Anal. Chem.*, 64:326.
- KATSUMATA, H; MATSUMOTO, T; KANECO, S; SUZUKI, T; OHTA, K (2008). Preconcentration of diazinon using multiwalled carbon nanotubes as solid-phase extraction adsorbents. *Microchem. J.*, 88:82.
- KEEGAN, J; WHELAN, M; DANAHER, M; CROOKS, S; SAYERS, R; ANASTASIO, A; ELLIOTT, C; BRANDON, D; FUREY, A; O'KENNEDY, R (2009). Benzimidazole carbamate residues in milk: detection by surface plasmon resonance-biosensor, using a modified QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) method for extraction. *Anal. Chim. Acta*, 654:111.
- KHUMMUENG, W; TRENERRY, C; ROSE, G; MARRIOT, PJ (2006). Application of comprehensive two-dimensional gas chromatography with nitrogen-selective detection for the analysis of fungicide residues in vegetable samples. *J. Chromatogr. A*, 1131:203.
- KING, S; MEYER, JS; ANDREWS, ARJ (2002). Screening method for polycyclic aromatic hydrocarbons in soil using hollow fiber membrane solvent microextraction. *J. Chromatogr. A*, 982:201.
- KINSELLA, B; LEHOTAY, SJ; MASTOVSKÁ, K; LIGHTFIELD, AR; FUREY, F; DANAHER, M (2009). New method for the analysis of flukicide and other anthelmintic residues in bovine milk and liver using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 637:196.
- KIRCHNER, M; HÚŠKOVÁ, R; MATISOVÁ, E; MOCÁK, J (2008). Fast gas chromatography for pesticide residues analysis using analyte protectants. *J. Chromatogr. A*, 1186:271.
- KOESUKWIWAT, U; SANGUANKAEW, K; LEEPIPATPIBOON, N (2008). Rapid determination of phenoxy acid residues in rice by modified QuEChERS extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 626:10.
- KOLLER, M; ECKERT, H (1997). Derivatization of peptides for their determination by chromatographic methods. *Anal. Chim. Acta*, 352:31.
- KOLTHOFF, IM; BRUCKENSTEIN, S; CHANTOONI, MK (1961). Acid-base equilibria in acetonitrile. Spectrophotometric and conductometric determination of the dissociation of various acids. *J. Am. Chem. Soc.*, 83:3927.
- KRAUSE, RT (1983). Determination of fluorescent pesticides and metabolites by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 255:497.
- KRYNITSKY, AJ (1997). Determination of sulfonylurea herbicides in water by capillary electrophoresis and by liquid chromatography/mass spectrometry. *J. AOAC Int.*, 80:392.
- L**
- LAGANÀ, A; FAGO, G; MARINO, A (1998). Determination of aryloxyphenoxypropionic acid herbicides in water using different solid-phase extraction procedures and liquid chromatography-diode array detection. *J. Chromatogr. A*, 796:309.
- LAMBROPOULOU, DA; ALBANIS, TA (2004). Sensitive trace enrichment of environmental andriandrogen vinclozolin from natural waters and sediment samples using hollow-fiber liquid-phase microextraction. *J. Chromatogr. A*, 1061:11.

- LAMBROPOULOU, DA; ALBANIS, TA (2007). Liquid-phase micro-extraction techniques in pesticide residue analysis. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 70:195.
- LANDERS, JP (2008). Introduction to capillary electrophoresis. En: Landers, JP (2008). Capillary and microchip electrophoresis and associated microtechniques. Taylor & Francis Group. Florida.
- LARSEN, AS; HOLBREY, JD; THAM, FS; REED, CA (2000). Designing ionic liquids: imidazolium melts with inert carborane anions. *J. Am. Chem. Soc.* 122:7264.
- LEANDRO, CC; HANCOCK, P; FUSSELL, RJ; KEELY, BJ (2007). Ultra-performance liquid chromatography for the determination of pesticide residues in foods by tandem quadrupole mass spectrometry with polarity switching. *J. Chromatogr. A*, 1144:161.
- LEE, J; KIM, YK; MIN, DH (2010). Laser desorption/ionization mass spectrometric assay for phospholipase activity based on graphene oxide/carbon nanotube double-layer films. *J. Am. Chem. Soc.*, 132:14714.
- LEE, J; LEE, HK; RASMUSSEN, KE; PEDERSEN-BJERGAARD, S (2008). Environmental and bioanalytical applications of hollow fiber membrane liquid-phase microextraction: a review. *Anal. Chim. Acta*, 624:253.
- LEHOTAY, SJ (2007). Determination of pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate: collaborative study. *J. AOAC Int.*, 90:485.
- LEHOTAY, SJ; MAŠTOVSKÁ, K; LIGHTFIELD, AR (2005a). Use of buffering and other means to improve results of problematic pesticides in a fast and easy method for residue analysis of fruits and vegetables. *J. AOAC Int.*, 88:615.
- LEHOTAY, SJ; MAŠTOVSKÁ, K; YUN, SJ (2005b). Evaluation of two fast and easy methods for pesticide residue analysis in fatty food matrixes. *J. AOAC Int.*, 88:630.
- LEHOTAY, SJ; SON, KA; KWON, H; KOWSUKKIWAT, U; FU, W; MAŠTOVSKA, K; HOH, E; LEEPIPATIBOON, N (2010). Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. *J. Chromatogr. A*, 1217:2548.
- LEÓN-GONZÁLEZ, ME; PÉREZ-ARRIBAS, LV; POLO DÍEZ, LM; PANIS, C; SAN ANDRÉS, MP (2001). Determination of triazine herbicides by capillary liquid chromatography with on-column focusing and temperature gradient. *Anal. Chim. Acta*, 445:29.
- LESUEUR, C; GARTNER, M; MENTLER, A; FUERHACKER, M (2008). Comparison of four extraction methods for the analysis of 24 pesticides in soil samples with gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-ion trap-mass spectrometry. *Talanta*, 75:284.
- LI, L; LI, W; GE, J; JIANG, S; LIU, F (2008). Use of graphitic carbon black and primary secondary amine for determination of 17 organophosphorus pesticide residues in spinach. *J. Sep. Sci.*, 31:3588.
- LI, X; XU, S; PAN, C; ZHOU, H; JIANG, X; ZHANG, Y; YE, M; ZOU, H (2007). Enrichment of peptides from plasma for peptidome analysis using multiwalled carbon nanotubes. *J. Sep. Sci.*, 30:930.
- LIANG, P; LIU, Y; GUO, L (2005). Determination of trace rare earth elements by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry after preconcentration

with multiwalled carbon nanotubes. *Spectrochim. Acta Part B*, 60:125.

LIANG, P; LIU, Y; ZENG, J; LU, H (2004). Multiwalled carbon nanotubes as solid-phase extraction adsorbent for the preconcentration of trace metal ions and their determination by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.*, 19:1489.

LIANG, P; ZHAO, E; DING, Q; DU, D (2008). Multiwalled carbon nanotubes microcolumn preconcentration and determination of gold in geological and water samples by flame atomic absorption spectrometry. *Spectrochim. Acta Part B*, 63:714.

LIU, HX; SONG, JM; HAN, P; LI, YB; ZHANG, SS; LIU, HM; WU, YJ (2006). Separation and determination of 2,4-D, dicamba and 2,4,5-T in tobacco by nonaqueous capillary electrophoresis. *J. Sep. Sci.*, 29:1038.

LIU, J; LI, L; NING, Z; ZHAO, P; FAN, H (2008a). Multi-layer cartridges filled with multi-walled carbon nanotubes for the determination of volatile organic compounds in indoor air. *Anal. Sci.*, 24:515.

LIU, JF; JÓNSSON, JÁ; JIANG, GB (2005). Application of ionic liquids in analytical chemistry. *Trends Anal. Chem.*, 24:20.

LIU, M; YANG, H; LIU, H; HAN, P; WANG, X; ZHANG, S; WU, Y (2008b). Development of high-performance liquid chromatography and non-aqueous capillary electrophoresis methods for the determination of fenoxycarb residues in wheat samples. *J. Sci. Food Agric.*, 88:62.

LIU, R; LIU, JF; YIN, YG; HU, XL; JIANG, GB (2009a). Ionic liquids in sample preparation. *Anal. Bioanal. Chem.*, 393:871.

LIU, SJ; ZHOU, XH; ZHAO, L; LIU, X; JIANG, SX (2004). Surface confined ionic liquid-a new stationary phase for the separation of ephedrine in high-performance liquid chromatography. *Chin. Chem. Lett.*, 15:1060.

LIU, Y; ZHAO, E; ZHU, W; GAO, H; ZHOU, Z (2009b). Determination of four heterocyclic insecticides by ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction in water samples. *J. Chromatogr. A*, 1216:885.

LÓPEZ-FERIA, S; CÁRDENAS, S; VALCÁRCEL, M (2009). One step carbon nanotubes-based solid-phase extraction for the gas chromatographic-mass spectrometric multiclass pesticide control in virgin olive oils. *J. Chromatogr. A*, 1216:7346.

LU, H; LIN, Y; WILSON, PC (2009). Organic-solvent-free extraction method for determination of carbamate and carbamoyloxime pesticides in soil and sediment samples. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 83:621.

LU, Q; CHEN, X; NIE, L; JIANG, H; CHEN, L; HU, Q; DU, S; ZHANG, Z (2010). Tuning of the vinyl groups' spacing at surface of modified silica in preparation of high density imprinted layer-coated silica nanoparticles: A dispersive solid-phase extraction materials for chlorpyrifos. *Talanta*, 81:959.

LUCHA CONTRA LA CONTAMINACIÓN AGRÍCOLA DE LOS RECURSOS HÍDRICOS, ESTUDIO FAO RIEGO Y DRENAJE, ARTÍCULO 55, 1997 (<http://www.fao.org/docrep/w2598e/w2598e07.htm>, consultada en mayo de 2012).

M

MACEDO DA SILVA, J; ALCARAZ ZINI, C; CARAMÃO, E (2011). Evaluation of comprehensive two-dimensional gas chromatography with micro-electron capture

- detection for the analysis of seven pesticides in sediment samples. *J. Chromatogr. A*, 1218:3166.
- MALIK, AK; FAUBEL, W (2001). A review of analysis of pesticides using capillary electrophoresis. *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 31:223.
- MALLAT, E; BARCELÓ, D; TAULER, R (1997). Degradation study of benomyl and carbendazim in water by liquid chromatography and multivariate curve resolution methods. *Chromatographia*, 46:342.
- MAO, T; HAO, B; HE, J; LI, W; LI, S; YU, Z (2009). Ultrasound assisted ionic liquid dispersive liquid phase extraction of lovastatin and simvastatin: A new pretreatment procedure. *J. Sep. Sci.*, 32:3029.
- MARRIOT, P.J; CHIN, ST; MAIKHUNTHOD, B; SCHMARR, HG; BIERI, S (2012). Multidimensional gas chromatography. *Trends Anal. Chem.* 34:1.
- MARTINELANGO, PK; ANDERSON, JL; DASGUPTA, PK; ARMSTRONG, DW; AL-HORR, RS; SLINGSBY, RW (2005). Gas-phase ion association provides increased selectivity and sensitivity for measuring perchlorate by mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 77:4829.
- MAŠTOVSKÁ, K; DORWEILER, KJ; LEHOTAY, SJ; WEGSCHEID, JS; SZPYLKA, KA (2010). Pesticide multiresidue analysis in cereal grains using modified QuEChERS method combined with automated direct sample introduction GC-TOFMS and UPLC-MS/MS techniques. *J. Agric. Food Chem.*, 58:5959.
- MATISOVÁ, E; DÖMÖTÖROVÁ, M (2003). Fast chromatography and its use in trace analysis. *J. Chromatogr. A*, 1000:199.
- MENA, E; DELLA NEGRA, F; PRATO, M; TAGMATARCHIS, N; CIOGLI, A; GASPARRINI, F; MISITA, D; VILLANI, C (2006). Carbon nanotubes on HPLC silica microspheres. *Carbon*, 44:1609.
- MENG, L; FU, C; LU, Q (2009). Advanced technology for functionalization of carbon nanotubes. *Prog. Nat. Sci.*, 19:801.
- MENZINGER, F; SCHMITT-KÖPPLIN, PH; FROMMBERGER, M; FREITAG, D; KETTRUP, A (2001). Partial-filling micellar electrokinetic chromatography and non-aqueous capillary electrophoresis for the analysis of selected agrochemicals. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 371:25.
- MERLI, D; SPELTINI, A; RAVELLI, D; QUARTARONE, E; COSTA, L; PROFUMO, A (2010). Multi-walled carbon nanotubes as the gas chromatographic stationary phase: role of their functionalization in the analysis of aliphatic alcohols and esters. *J. Chromatogr. A*, 1217:7275.
- MÉTODOS OFICIALES DE ANÁLISIS (2004), Tomo III, 223-224. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA). *Dirección General de Política Alimentaria*.
- METSON, AJ (1961). Methods of chemical analysis of soil survey samples. *Department of Scientific and Industrial Research. Bull.* 12, 208, Nueva Zelanda.
- MIN, G; WANG, S; ZHU, H; FANG, G; ZHANG, Y (2008). Multi-walled carbon nanotubes as solid-phase extraction adsorbents for determination of atrazine and its principal metabolites in water and soil samples by gas chromatography-mass spectrometry. *Sci. Total Environ.*, 396:79.
- MIRZAEI, M; DINPANAH, H (2011). Three phases hollow fiber LPME combined with

- HPLC-UV for extraction, preconcentration and determination of valerenic acid in *Valeriana officinalis*. *J. Chromatogr. B*, 879:1870.
- MOINFAR, S; HOSSEINI, MRM (2009). Development of dispersive liquid-liquid microextraction method for the analysis of organophosphorus pesticides in tea. *J. Hazard. Mater.*, 169:907.
- MOLINER-MARTÍNEZ, Y; MOLINS-LEGUA, C; VERDÚ-ANDRÉS, J; HERRÁEZ-HERNÁNDEZ, R; CAMPÍNS-FALCÓ, P (2011). Advantages of monolithic over particulate columns for multiresidue analysis of organic pollutants by in-tube solid-phase microextraction coupled to capillary liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1218:6256.
- MONETI, G; PIERACCINI, G; BARTOLUCCI, G; FUIDA, G; SERAGLIA, R; TRALDI, P (2001). Direct coupling of a nano-high-performance liquid chromatography column to an ion trap designed for a gas chromatography/mass spectrometry system. *Rapid. Commun. Mass Spectrom.*, 2001, 15:1609.
- MONTES, R; RODRÍGUEZ, I; RUBÍ, E; RAMIL, M; CELA, R (2008). Suitability of polypropylene microporous membranes for liquid- and solid-phase extraction of halogenated anisoles from water samples. *J. Chromatogr. A*, 1198-1199:21.
- MORALES-CID, G; FAKETE, A; SIMONET, BM; LEHMANN, R; CÁRDENAS, S; ZHANG, X; VALCÁRCEL, M; SCHMITT-KOPLIN, P (2010). In situ synthesis of magnetic multiwalled carbon nanotube composites for the clean-up of (fluoro)quinolones from human plasma prior to ultrahigh pressure liquid chromatography analysis. *Anal. Chem.*, 82:2743.
- MOSTAFAVI, ST; MEHRNIA, MR; RASHIDI, AM (2009). Preparation of nanofilter from carbon nanotubes for application in virus removal from water. *Desalination*, 238:271.
- MOTOHASHI, N; NAGASHIMA, H; MEYER, R (1991). High-performance liquid chromatography of fungicides in citrus fruits. *J. Liq. Chromatogr.*, 587:321.
- MWONGELA, SM; NUMAN, A; GILL, NL; AGBARIA, RA; WARNER, IM (2003). Separation of achiral and chiral analytes using polymeric surfactants with ionic liquids as modifiers in micellar electrokinetic chromatography. *Anal. Chem.*, 75:6089.
- ## N
- NAEENI, MH; YAMINI, Y; REZAEI, M (2011). Combination of supercritical fluid extraction with dispersive liquid-liquid microextraction for extraction of organophosphorus pesticides from soil and marine sediment samples. *J. Supercrit. Fluids*, 57:219.
- NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY (INSTITUTO NACIONAL DE ESTÁNDARES Y TECNOLOGÍA), LIBRERÍA VIRTUAL NIST (<http://www.nist.gov>, consultada en octubre de 2009).
- NGUYEN, TD; GUILLARME, D; RUDAZ, S; VEUTHEY, JL (2006). Fast analysis in liquid chromatography using small particle size and high pressure. *J. Sep. Sci.*, 29:1836.
- NGUYEN, TD; HAN, EM; SEO, MS; KIM, SR; YUN, MY; LEE, DM; LEE, GH (2008). A multi-residue method for the determination of 203 pesticides in rice paddies using gas chromatography/mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 619:67.
- NGUYEN, TD; LEE, BS; LEE, BR; LEE, DM; LEE, GH (2007). A multiresidue method for the determination of 109 pesticides in rice

using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) sample preparation method and gas chromatography/mass spectrometry with temperature control and vacuum concentration. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 21:3115.

NGUYEN, TD; LEE, KJ; LEE, MH; LEE, GH (2009). A multiresidue method for the determination 234 pesticides in Korean herbs using gas chromatography mass spectrometry. *Microchem. J.*, 95:43.

NISCHANG, I; TEASDALE, I; BRÜGGEMANN, O (2010). Towards porous polymer monoliths for the efficient, retention-independent performance in the isocratic separation of small molecules by means of nano-liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1217:7514.

NORMA EN 15662:2009, Alimentos de origen vegetal. Determinación de residuos de plaguicidas utilizando GC-MS y/o LC-MS/MS seguido de extracción/división de acetonitrilo y método de purificación dispersiva SPE-QuEChERS. *Comité Europeo de Estandarización (CEN)* (<http://www.cen.eu>, consultada en mayo de 2012).

NÚÑEZ, O; GALLART-AYALA, H; MARTINS, CPB; LUCCI, P (2012). New trends in fast liquid chromatography for food and environmental analysis. *J. Chromatogr. A*, 1228:298.

NÚÑEZ, O; MOYANO, E; GALCERÁN, MT (2002). Solid-phase extraction and sample stacking-capillary electrophoresis for the determination of quaternary ammonium herbicides in drinking water. *J. Chromatogr. A*, 946:275.

O

OLSEN, BA; CASTLE, BC; MYERS, DP (2006). Advances in HPLC technology for the determination of drug impurities. *Trends Anal. Chem.*, 25:796.

P

PADRÓN-SANZ, C; HALKO, R; SOSA-FERRERA, Z; SANTANA-RODRÍGUEZ, JJ (2005). Combination of microwave assisted micellar extraction and liquid chromatography for the determination of organophosphorus pesticides in soil samples. *J. Chromatogr. A*, 1078:13.

PAGE, AL; MILLER, RH; HEENEY, DR (1987). Methods of soil analysis, *Am. Soc. Agron. Inc., Soil Sci. Soc. Am. Inc.*, Madison, Estados Unidos de América.

PAÍGA, P; MORAIS, S; CORREIA, M; ALVES, A; DELERUE-MATOS, C (2008). A multiresidue method for the analysis of carbamate and urea pesticides from soils by microwave-assisted extraction and liquid chromatography with photodiode array detection. *Anal. Lett.*, 41:1751.

PAKADE, YB; TEWARY, DK (2010). Development and applications of single-drop microextraction for pesticide residue analysis: a review. *J. Sep. Sci.*, 33:3683.

PAVEL, J (2012). Comprehensive two-dimensional liquid chromatography - practical impacts of theoretical considerations. A review. *Cent. Eur. J. Chem.*, 10:844.

PEDERSEN-BJERGAARD, S; RASMUSSEN, KE (1999). Liquid-liquid-liquid microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis. *Anal. Chem.*, 71:2650.

- PEDERSEN-BJERGAARD, S; RASMUSSEN, KE (2008). Liquid-phase microextraction with porous hollow fibers, a miniaturized and highly flexible format for liquid-liquid extraction. *J. Chromatogr. A*, 1184:132.
- PENG, Y; XIE, Y; LUO, J; NIE, L; CHEN, Y; CHEN, L; DU, S; ZHANG, Z (2010). Molecularly imprinted polymer layer-coated silica nanoparticles toward dispersive solid-phase extraction of trace sulfonylurea herbicides from soil and crop samples. *Anal. Chim. Acta*, 674:190.
- PENA, MT; CASAIS, MC; MEJUTO, MC; CELA, R (2009). Development of an ionic liquid based dispersive liquid-liquid microextraction method for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples. *J. Chromatogr. A*, 1216:6356.
- PICÓ, Y; RODRÍGUEZ, R; MAÑES, J (2003). Capillary electrophoresis for the determination of pesticide residues. *Trends Anal. Chem.*, 22:133.
- PIERZYNSKI, GM; SIMS, JT; VANCE, GF (2000). Organic chemicals in the environment, en: Soils and environmental quality, CRC Press (2nd Ed.), Lewis Publishers, Estados Unidos de América.
- PINTO, MI; SONTAG, G; BERNARDINO, RJ; NORONHA, JP (2010). Pesticides in water and the performance of the liquid-phase microextraction based techniques. A review. *Microchem. J.*, 96:225.
- PLAZA BOLAÑOS, P; ROMERO-GONZÁLEZ, R; GARRIDO FRENICH, A; MARTÍNEZ VIDAL, JL (2008). Application of hollow fibre liquid phase microextraction for the multiresidue determination of pesticides in alcoholic beverages by ultra-high pressure liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1208:16.
- PLOSSL, F; GIERA, M; BRACHER, F (2006). Multiresidue analytical method using dispersive solid-phase extraction and gas chromatography/ion trap mass spectrometry to determine pharmaceuticals in whole blood. *J. Chromatogr. A*, 1135:19.
- POOLE, CF (2007). Matrix-induced response enhancement in pesticide residue analysis by gas chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1158:241.
- POOLE, CF; KERSTEN, BR; HO, SSJ; CODDENS, ME; FURTON, KG (1986). Organic salts, liquid at room temperature, as mobile phases in liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 352:407.
- PORRAS, SP; KENNDLER, E (2004). Capillary zone electrophoresis in non-aqueous solutions: pH of the background electrolyte. *J. Chromatogr. A*, 1037:455.
- PORTA CASANELLAS, J (1986). Técnicas y experimentos en edafología. *Collegi oficial d'enginyers agrònoms de Catalunya*, Barcelona, España.
- PRADO-ROSALES, RC; HERRERA, MC; LUQUE-GARCÍA, JL; LUQUE DE CASTRO, MD (2004). Study of the feasibility of focused microwave-assisted Soxhlet extraction of *N*-methylcarbamates from soil. *J. Chromatogr. A*, 953:133.
- PRINCIPIOS DEL MANEJO INTEGRADO DE PLAGAS, AGENCIA PARA LA PROTECCIÓN MEDIOAMBIENTAL DE LOS ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA (EPA) (<http://www.epa.gov/pesticides/factsheets/ipm-sp.html>, consultada en mayo de 2012).
- PRZYBYLSKI, C; SEGARD, C (2009). Method for routine screening of pesticides and metabolites in meat based baby-food using extraction and gas chromatography-mass

spectrometry. *J. Sep. Sci.*, 32:1858.

PSILLAKIS, E; KALOGERAKIS, N (2003). Developments in liquid-phase microextraction. *Trends Anal. Chem.* 22:565.

PYRZYNSKA, K (2011). Carbon nanotubes as sorbents in the analysis of pesticides. *Chemosphere*, 83:1407.

Q

QIN, W; LI, SFY (2002). An ionic liquid coating for determination of sildenafil and UK-103,320 in human serum by capillary zone electrophoresis-ion trap mass spectrometry. *Electrophoresis*, 23:4110.

QUIRINO, JP; TERABE, S (2000). Sample stacking of cationic and anionic analytes in capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 902:119.

R

RAMALHOSA, MJ; PAÍGA, P; MORAIS, S; DELERUE-MATOS, C; PINTO OLIVEIRA, MBP (2009). Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in fish: evaluation of a quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe extraction method. *J. Sep. Sci.*, 32:3529.

RAPOSO JÚNIOR, JL; RÉ-POPPI, N (2007). Determination of organochlorine pesticides in ground water samples using solid-phase microextraction by gas chromatography-electron capture detection. *Talanta*, 72:1833.

RAVELO-PÉREZ, LM; HERNÁNDEZ-BORGES, J; CIFUENTES, A; RODRÍGUEZ-DELGADO, MA (2007). MEKC combined with SPE and sample stacking for multiple analysis of pesticides in water samples at the ng/L level. *Electrophoresis*, 28:1805.

RAVELO-PÉREZ, LM; HERNÁNDEZ-BORGES, J; RODRÍGUEZ-DELGADO, MA (2008a). Multi-

walled carbon nanotubes as efficient solid-phase extraction materials of organophosphorus pesticides from apple, grape, orange and pineapple fruit juices. *J. Chromatogr. A*, 1211:33.

RAVELO-PÉREZ, LM; HERNÁNDEZ-BORGES, J; RODRÍGUEZ-DELGADO, MA (2008b). Multiwalled carbon nanotubes as solid-phase extraction materials for the gas chromatographic determination of organophosphorus pesticides in waters. *J. Sep. Sci.* 31:3612.

RAWN, DFK; JUDGE, J; ROSCOE, V (2010). Application of the QuEChERS method for the analysis of pyrethrins and pyrethroids in fish tissues. *Anal. Bioanal. Chem.*, 397:2525.

REGLAMENTO (UE) N° 915/2010 DE LA COMISIÓN DE 13 DE OCTUBRE DE 2010, relativo a un programa plurianual coordinado de control de la Unión para 2011, 2012 y 2013 destinado a garantizar el respeto de los LMRs de plaguicidas en los alimentos de origen vegetal y animal o sobre los mismos y a evaluar el grado de exposición de los consumidores a estos residuos. (*Diario oficial de la UE*, L 269/8 de 13.10.2010).

REN, Z; ZHANG, W; MENG, H; LIU, J; WANG, S (2010). Extraction separation of Cu(II) and Co(II) from sulfuric solutions by hollow fiber renewal liquid membrane. *J. Membr. Sci.*, 365:2660.

REZAEI, M; ASSADI, Y; MILANI HOSSEINI, MR; AGHAEI, E; AHMADI, F; BERIJANI, S (2006). Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. *J. Chromatogr. A*, 1116:1.

REZAEI, M; YAMINI, Y; FARAJI, M (2010). Evolution of dispersive liquid-liquid microextraction method. *J. Chromatogr. A*, 1217:2342.

RIDGWAY, K; LALLJIE, SPD; SMITH, RM (2007). Sample preparation techniques for the determination of trace residues and contaminants in foods. *J. Chromatogr. A*, 1153:36.

RIEKKOLA, ML (2002). Recent advances in nonaqueous capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 23:3865.

RIEKKOLA, ML; JUSSILA, M; PORRAS, SP; VALKÓ, IE (2000). Non-aqueous capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A*, 892:155.

RODRÍGUEZ-GONZALO, E; CARABIAS-MARTÍNEZ, R; MIRANDA CRUZ, E; DOMÍNGUEZ-ÁLVAREZ, J; HERNÁNDEZ-MÉNDEZ, J (2009). Ultrasonic solvent extraction and nonaqueous CE for the determination of herbicide residues in potatoes. *J. Sep. Sci.*, 32:575.

ROMERO, J; LÓPEZ, P; RUBIO, C; BATLLE, R; NERÍN, C (2007). Strategies for single-drop microextraction optimisation and validation: application to the detection of potential antimicrobial agents. *J. Chromatogr. A*, 1166:24.

ROSALES-CONRADO, N; LEÓN-GONZÁLEZ, ME; D'ORAZIO, G; FANALI, S (2004). Enantiomeric separation of chlorophenoxy acid herbicides by nano liquid chromatography-UV detection on a vancomycin-based chiral stationary phase. *J. Sep. Sci.*, 27:1303.

ROSALES-CONRADO, N; LEÓN-GONZÁLEZ, ME; PÉREZ-ARRIBAS, LV; POLO-DÍEZ, LM (2002). Determination of chlorophenoxy acid herbicides and their esters in soil by capillary high performance liquid chromatography with ultraviolet detection, using large volume injection and temperature gradient. *Anal. Chim. Acta*, 470:147.

ROSALES-CONRADO, N; LEÓN-GONZÁLEZ, ME; PÉREZ-ARRIBAS, LV; POLO-DÍEZ, LM (2005).

Capillary liquid chromatography of chlorophenoxy acid herbicides and their esters in apple juice samples after preconcentration on a cation exchanger based on polydivinylbenzene-*N*-vinylpyrrolidone. *J. Chromatogr. A*, 1076:202.

S

SADÍLEK, P; ŠATÍNSKÝ, D; SOLICH, P (2007). Using restricted-access materials and column switching in high-performance liquid chromatography for direct analysis of biologically-active compounds in complex matrices. *Trends Anal. Chem.*, 26:375.

SAFAVI, A; MALEKI, N; DOROODMAND, MM (2010). Single-walled carbon nanotubes as stationary phase in gas chromatographic separation and determination of argon, carbon dioxide and hydrogen. *Anal. Chim. Acta*, 675:207.

SÁNCHEZ-BRUNETE, C; RODRIGUEZ, A; TADEO, JL (2003). Multiresidue analysis of carbamate pesticides in soil by sonication-assisted extraction in small columns and liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1007:85.

SANTOS, FJ; GALCERÁN, MT (2002). The application of gas chromatography to environmental analysis. *Trends Anal. Chem.*, 21:672.

SARAFRAZ-YAZDI, A; AMIRI, A (2010). Liquid-phase microextraction. *Trends Anal. Chem.*, 29:1.

SCHENCK, FJ; BROWN, AN; PODHORNIAK, LV; PARKER, A; RELIFORD, M; WONG, JW (2008). A rapid multiresidue method for determination of pesticides in fruits and vegetables by using acetonitrile extraction/partitioning and solid-phase extraction column cleanup. *J. AOAC Int.*,

91:422.

SCHMECK, T; WENCLAWIAK, BW (2005). Sediment matrix induced response enhancement in the gas chromatographic-mass spectrometric quantification of insecticides in four different solvent extracts from ultrasonic and soxhlet extraction. *Chromatographia*, 62:159.

SCHUSSLER, W (1990). Automatic measurement of bentazone and phenoxy acid herbicides by HPLC with three different detectors. *Chromatographia*, 29:24.

SHRIVAS, K; WU, HF (2008). Oxidized multiwalled carbon nanotubes for quantitative determination of cationic surfactants in water samples using atmospheric pressure matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 628:198.

SHRIVAS, K; WU, HF (2010). Multifunctional nanoparticles composite for MALDI-MS: Cd²⁺-doped carbon nanotubes with CdS nanoparticles as the matrix, preconcentrating and accelerating probes of microwave enzymatic digestion of peptides and proteins for direct MALDI-MS analysis. *J. Mass. Spectrom.*, 45:1452.

SILVA, M (2009). Micellar electrokinetic chromatography: methodological and instrumental advances focused on practical aspects. *Electrophoresis*, 30:50.

SIMPSON JR SL; QUIRINO, JP; TERABE, S (2008). On-line sample preconcentration in capillary electrophoresis: Fundamentals and applications. *J. Chromatogr. A*, 1184:504.

SINHA, SN; PAL, R; DEWAN, A; MANSURI, MM; SAIYED, HN (2006). Effect of dissociation energy on ion formation and sensitivity of an analytical method for determination of

chlorpyrifos in human blood, using gas chromatography-mass spectrometer (GC-MS in MS/MS). *Int. J. Mass Spectrom.*, 253:48.

SSEBUGERE, P; WASSWA, J; MBABAZI, J; NYANZI, SA; KIREMIRE, BT; MARCO, JAM (2010). Organochlorine pesticides in soils from south-western Uganda. *Chemosphere*, 78:1250.

SUÁREZ, B; SANTOS, B; SIMONET, BM; CÁRDENAS, S; VALCÁRCEL, M (2007a). Solid-phase extraction-capillary electrophoresis-mass spectrometry for the determination of tetracyclines residues in surface water by using carbon nanotubes as sorbent material. *J. Chromatogr. A*, 1175:127.

SUÁREZ, B; SIMONET, BM; CÁRDENAS, S; VALCÁRCEL, M (2007b). Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in urine by combining an immobilized carboxylated carbon nanotubes minicolumn for solid-phase extraction with capillary electrophoresis-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1159:203.

SUÁREZ, B; SIMONET, BM; CÁRDENAS, S; VALCÁRCEL, M (2007c). Surfactant-coated single-walled carbon nanotubes as a novel pseudostationary phase in capillary EKC. *Electrophoresis*, 28:1714.

SUN, L; LEE, HK (2003). Optimization of microwave-assisted extraction and supercritical fluid extraction of carbamate pesticides in soil by experimental design methodology. *J. Chromatogr. A*, 1014:165.

SUN, P; ARMSTRONG, DW (2010). Ionic liquids in analytical chemistry. *Anal. Chim. Acta*, 661:1.

T

TANG, J; GAO, M; DENG, C; ZHANG, X (2008).

Recent development of multi-dimensional chromatography strategies in proteome research. *J. Chromatogr. B*, 866:123.

TANKIEWICZ, M; FENIK, J; BIZIUK, M (2010). Determination of organophosphorus and organonitrogen pesticides in water samples, *Trends Anal. Chem.*, 29:1050.

TANKIEWICZ, M; FENIK, J; BIZIUK, M (2011). Solventless and solvent-minimized sample preparation techniques for determining currently used pesticides in water samples: A review. *Talanta*, 86:8.

TEGELER, T; EL-RASSI, Z (2001). On-column trace enrichment by sequential frontal and elution electrochromatography. 1. Application to carbamate insecticides. *Anal. Chem.*, 73:3365.

TEUTENBERG, T (2009). Potential of high temperature liquid chromatography for the improvement of separation efficiency - A review. *Anal. Chim. Acta*, 643:1.

THESS, A; LEE, R; NIKOLAEV, P; DAI, H; PETIT, P; ROBERT, J; XU, C; LEE, YH; SMALEY, RE (1996). Crystalline Ropes of Metallic Carbon Nanotubes. *Science*, 273:483.

TROJANOWICZ, M (2006). Analytical applications of carbon nanotubes: a review. *Trends Anal. Chem.*, 25:480.

TSAI, WH; HUANG, TC; HUANG, JJ; HSUE, YH; CHUANG, HY (2009). Dispersive solid-phase microextraction method for sample extraction in the analysis of four tetracyclines in water and milk samples by high-performance liquid chromatography with diode-array detection. *J. Chromatogr. A*, 1216:2263.

TURIEL, E; MARTÍN-ESTEBAN, A; FERNÁNDEZ, P; PÉREZ-CONDE, C; CÁMARA, C (2001). Molecular recognition in a propazine-

imprinted polymer and its application to the determination of triazines in environmental samples. *Anal. Chem.*, 73:5133.

V

VAHER, M; KOEL, M; KALJURAND, M (2000). Non-aqueous capillary electrophoresis in acetonitrile using ionic-liquid buffer electrolytes. *Chromatographia*, 53:S302.

VALCÁRCEL, M; CÁRDENAS, S; SIMONET, BM; MOLINER-MARTÍNEZ, Y; LUCENA, R (2008). Carbon nanostructures as sorbent materials in analytical processes. *Trends Anal. Chem.*, 27:34.

VALDERRAMA, JO; ZARRICUETA, K (2009). A simple and generalized model for predicting the density of ionic liquids. *Fluid Phase Equilib.*, 275:145.

VAN DEURSEN, M; JANSSEN, HG; BEENS, J; LIPMAN, P; REINIERKENS, R; RUTTEN, G; CRAMERS, CA (2000). Fast gas chromatography using vacuum outlet conditions. *J. Microcol. Sep.* 12:613.

VAN LIESHOUT, M; VAN DEURSEN, M; DERKS, R; JANSSEN, HG; CRAMERS, CA (1999). A practical comparison of two recent strategies for fast gas chromatography: Packed capillary columns and multicapillary columns. *J. Microcol. Sep.* 11:155.

VISSERS, JPC; CLAESSENS, HA; CRAMERS, CA (1997). Microcolumn liquid chromatography: instrumentation, detection and applications. *J. Chromatogr. A*, 779:1.

VISSERS, JPC; DE RU, AH; URSEM, M; CHERVET, JP (1996). Optimised injection techniques for micro and capillary liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 746:1.

W

- WALORCZYK, S (2007). Development of a multi-residue screening method for the determination of pesticides in cereals and dry animal feed using gas chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1165:200.
- WALORCZYK, S (2008). Application of gas chromatography/tandem quadrupole mass spectrometry to the multi-residue analysis of pesticides in green leafy vegetables. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 22:3791.
- WANG, C; JI, S; WU, W; WU, C; WANG, Z (2011). Determination of triazine herbicides in environmental samples by dispersive liquid-liquid microextraction coupled with high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. Sci.*, 49:689.
- WANG, H; YAN, H; QIAO, J (2012). Miniaturized matrix solid-phase dispersion combined with ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of three pyrethroids in soil. *J. Sep. Sci.*, 35:292.
- WANG, JX; JIANG, DQ; GU, ZY; YAN, XP (2006a). Multiwalled carbon nanotubes coated fibers for solid-phase microextraction of polybrominated diphenyl ethers in water and milk samples before gas chromatography with electron-capture detection. *J. Chromatogr. A*, 1137:8.
- WANG, L; ZHAO, H; QIU, Y; ZHOU, Z (2006b). Determination of four benzodiazepine residues in pork using multiwalled carbon nanotube solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1136:99.
- WANG, S; ZHAO, P; MIN, G; FANG, G (2007). Multi-residue determination of pesticides in water using multi-walled carbon nanotubes solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1165:166.
- WANG, Y; YOU, J; REN, R; XIAO, Y; GAO, S; ZHANG, H; YU, A (2010). Determination of triazines in honey by dispersive liquid-liquid microextraction high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1217:4241.
- WELTON, T (1999). Room-temperature ionic liquids. Solvents for synthesis and catalysis. *Chem. Rev.*, 99:2071.
- WILKOWSKA, A; BIZIUK, M (2011). Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology. *Food Chem.*, 125:803.
- WORRALL, F; PARKER, A; RAE, JE; JOHNSON, AC (1999). A study of suspended and colloidal matter in the leachate from lysimeters and its role in pesticide transport. *J. Environ. Qual.*, 28:595.
- WU, H; WANG, X; LIU, B; LIU, Y; LI, S; LU, J; TIAN, J; ZHAO, W; YANG, Z (2011). Simultaneous speciation of inorganic arsenic and antimony in water samples by hydride generation-double channel atomic fluorescence spectrometry with on-line solid-phase extraction using single-walled carbon nanotubes micro-column. *Spectrochim. Acta Part B*, 66:74.
- WU, Q; LI, Y; WANG, C; LIU, Z; ZANG, X; ZHOU, X; WANG, Z (2009a). Dispersive liquid-liquid microextraction combined with high performance liquid chromatography-fluorescence detection for the determination of carbendazim and thiabendazole in environmental samples. *Anal. Chim. Acta*, 638:139.

WU, Q; WANG, C; LIU, Z; WU, C; ZENG, X; WEN, J; WANG, Z (2009b). Dispersive solid-phase extraction followed by dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of some sulfonylurea herbicides in soil by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1216:5504.

X

XIAO, Q; HU, B; DUAN, J; HE, M; ZU, W (2007). Analysis of PBDEs in soil, dust, spiked lake water, and human serum samples by hollow fiber-liquid phase microextraction combined with GC-ICP-MS. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 18:1740.

XIONG, J; HU, B (2008). Comparison of hollow fiber liquid phase microextraction and dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of organosulfur pesticides in environmental and beverage samples by gas chromatography with flame photometric detection. *J. Chromatogr. A*, 1193:7.

XU, L; BASHEER, C; LEE, HK (2010). Solvent-bar microextraction of herbicides combined with non-aqueous field-amplified sample injection capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A*, 1217:6036.

XU, Y; LI, SFY (2006). Carbon nanotube-enhanced separation of DNA fragments by a portable capillary electrophoresis system with contactless conductivity detection. *Electrophoresis*, 27:4025.

Y

YAN, H; LIU, B; DU, J; YANG, G; ROW, KH (2010). Ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of six pyrethroids in river water. *J. Chromatogr. A*, 1217:5152.

YANG, Q; BENSON, LM; JOHNSON, KL; NAYLOR, S (1999). Analysis of lipophilic peptides and therapeutic drugs: on-line-nonaqueous capillary electrophoresis-mass spectrometry. *J. Biochem. Bioph. Methods*, 24:103.

YANG, XB; YING, GG; KOOKANA, RS (2010). Rapid multiresidue determination for currently used pesticides in agricultural drainage waters and soils using gas chromatography-mass spectrometry. *J. Environ. Sci. Health., Part B*, 45:152.

YANG, Z; LIU, Y; LIU, D; ZHOU, Z (2012). Determination of organophosphorus pesticides in soil by dispersive liquid-liquid microextraction and gas chromatography. *J. Chromatogr. Sci.*, 50:15.

YAO, C; ANDERSON, JL (2009). Dispersive liquid-liquid microextraction using an in situ metathesis reaction to form an ionic liquid extraction phase for the preconcentration of aromatic compounds from water. *Anal. Bioanal. Chem.*, 395:1491.

YING, LS; SALLEH, MABM; YUSOFF, HM; RASHID, SBA; RAZAK, JBA (2011). Continuous production of carbon nanotubes-A review. *J. Ind. Eng. Chem.*, 17:367.

YUDTHAVORASIT, S; CHIAOCHAN, C; LEEPIPATPIBOON, N (2011). Simultaneous determination of multi-class antibiotic residues in water using carrier-mediated hollow-fiber liquid-phase microextraction coupled with ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Microchem. Acta*, 172:39.

Z

ZHANG, J; LEE, HK (2010). Headspace ionic liquid-based microdrop liquid-phase microextraction followed by microdrop

thermal desorption-gas chromatographic analysis. *Talanta*, 81:537.

ZHANG, X; FANG, A; RILEY, CP; WANG, M; REGNIER, FE; BUCK, C (2010a). Multi-dimensional liquid chromatography in proteomics-A review. *Anal. Chim. Acta*, 664:101.

ZHANG, Z; ZHANG, H; HU, Y; YAO, S (2010b). Synthesis and application of multi-walled carbon nanotubes-molecularly imprinted sol-gel composite material for on-line solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography determination of trace Sudan IV. *Anal. Chim. Acta*, 661:173.

ZANG, Z; HU, Z; LI, Z; HE, Q; CHANG, X (2009). Synthesis, characterization and application of ethylenediamine-modified multiwalled carbon nanotubes for selective solid-phase extraction and preconcentration of metal ions. *J. Hazard. Mater.*, 172:958.

ZHAO, H; WANG, L; QIU, Y; ZHOU, Z; ZHONG, W; LI, X (2007). Multiwalled carbon nanotubes as a solid-phase extraction adsorbent for the determination of three barbiturates in pork by ion trap gas chromatography-tandem mass spectrometry (GC/MS/MS) following microwave assisted derivatization. *Anal. Chim. Acta*, 586:399.

ZHOU, Q; BAI, H; XIE, G; XIAO, J (2008a). Temperature-controlled ionic liquid dispersive liquid phase micro-extraction. *J. Chromatogr. A*, 1177:43.

ZHOU, Q; XIAO, J; WANG, W (2007c). Trace analysis of triasulfuron and bensulfuron-methyl in water samples using a carbon nanotubes packed cartridge in combination with high-performance liquid chromatography. *Microchim. Acta*, 157:93.

ZHOU, Q; DING, Y; XIAO, J (2006a). Sensitive determination of thiamethoxam, imidacloprid and acetamiprid in environmental water samples with solid-phase extraction packed with multiwalled carbon nanotubes prior to high-performance liquid chromatography. *Anal. Bioanal. Chem.*, 385:1520.

ZHOU, Q; DING, Y; XIAO, J (2007a). Simultaneous determination of cyanazine, chlorotoluron and chlorbenzuron in environmental water samples with SPE multiwalled carbon nanotubes and LC. *Chromatographia*, 65:25.

ZHOU, Q; WANG, W; XIAO, J (2006b). Preconcentration and determination of nicosulfuron, thifensulfuron-methyl and metsulfuron-methyl in water samples using carbon nanotubes packed cartridge in combination with high performance liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta*, 559:200.

ZHOU, Q; XIAO, J; DING, Y (2007b). Sensitive determination of fungicides and prometryn in environmental water samples using multiwalled carbon nanotubes solid-phase extraction cartridge. *Anal. Chim. Acta*, 602:223.

ZHOU, Q; XIAO, J; WANG, W (2006c). Using multi-walled carbon nanotubes as solid phase extraction adsorbents to determine dichlorodiphenyltrichloroethane and its metabolites at trace level in water samples by high performance liquid chromatography with UV detection. *J. Chromatogr. A*, 1125:152.

ZHOU, Q; XIAO, J; WANG, W; LIU, G; SHI, Q; WANG, J (2006d). Determination of atrazine and simazine in environmental water samples using multiwalled carbon nanotubes as the adsorbents for preconcentration prior to high performance liquid chromatography with diode array detector. *Talanta*, 68:1309.

ZHOU, Q; XIAO, J; XIE, G; WANG, W; DING, Y; BAI, H (2009). Enrichment of pyrethroid residues in environmental waters using a multiwalled carbon nanotubes cartridge, and analysis in combination with high performance liquid chromatography. *Microchim. Acta*, 164:419.

ZHOU, QX; XIE, GH; XIAO, JP; WANG, WD; DING, YJ (2008b). Sensitive determination of fenpropathrin, cyhalothrin and deltamethrin in environmental water samples using multiwalled carbon nanotubes cartridge prior to HPLC. *Chin. Chem. Lett.*, 19:95.

ZHOU, Y; HAN, L; CHENG, J; GUO, F; ZHI, X; HU, H; CHEN, G (2011). Dispersive liquid-liquid microextraction based on the solidification of a floating organic droplet for simultaneous analysis of diethofencarb and pyrimethanil in apple pulp and peel. *Anal. Bioanal. Chem.*, 399:1901.

ZHU, L; EE, KH; ZHAO, L; LEE, HK (2002). Analysis of phenoxy herbicides in bovine milk by means of liquid-liquid-liquid microextraction with a hollow-fiber membrane. *J. Chromatogr. A*, 963:335.

ZHU, X; YANG, J; SU, Q; CAI, J; GAO, Y (2005). Selective solid-phase extraction using molecularly imprinted polymer for the analysis of polar organophosphorus pesticides in water and soil samples. *J. Chromatogr. A*, 1092:161.

ZULIN, Z; HUASHENG, H; XINHONG, W; JIANQING, L; WEIQI, C; LI, X (2002). Determination and load of organophosphorus and organochlorine pesticides at water from Jiulong River Estuary, China. *Mar. Pollut. Bull.*, 45:397.

GLOSARIO

GLOSARIO

| | |
|-------|--------------------------------|
| 2-4-D | Ácido 2,4-diclorofenoxiacético |
| 2D | Dos dimensiones |

A

| | |
|-----|----------------------------------|
| ACN | Acetonitrilo |
| API | Ionización a presión atmosférica |

B

| | |
|-----|---------------------------|
| BGE | Electrolito de separación |
| BHC | Hexaclorobenceno |

C

| | |
|------|---|
| CCD | Diseño experimental compuesto centrado |
| CE | Electroforesis capilar |
| CEC | Electrocromatografía capilar |
| CFME | Microextracción en gota en flujo continuo |
| CGE | Electroforesis capilar en gel |
| CID | Disociación inducida por colisión |
| CIEF | Isoelectroenfoque capilar |
| CITP | Isotacoforesis capilar |
| CLC | Cromatografía líquida capilar |
| CNTs | Nanotubos de carbono |
| CPE | Extracción en punto de nube |
| CVD | Deposición de vapor químico |
| CZE | Electroforesis capilar en zona libre |

D

| | |
|---------|--|
| d.e. | Diámetro externo |
| d.i. | Diámetro interno |
| DCM | Diclorometano |
| DDME | Microextracción gota a gota |
| DDT | Dicloro difenil tricloroetano |
| DI-SDME | Microextracción en gota de inmersión directa |
| DLLME | Microextracción líquido-líquido dispersiva |
| DMA | Directiva Marco del Agua |
| DSDME | Microextracción en gota flotante |
| dSPE | Extracción en fase sólida dispersiva |

E

| | |
|-----|---------------------------------|
| ECD | Detector de captura electrónica |
| EI | Impacto electrónico |
| EOF | Flujo electroosmótico |
| ESI | Ionización por electrospray |

F

| | |
|----------|---|
| FAO | Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura |
| FASS | <i>Stacking</i> por amplificación del campo |
| FD | Detección por fluorescencia |
| FESI | Inyección por amplificación del campo |
| FO-DLLME | Microextracción líquido-líquido dispersiva con gota flotante |
| FPD | Detector de fotometría de llama |

G

| | |
|-------|--|
| GC | Cromatografía de gases |
| GCB | Carbón negro grafitizado |
| GCxGC | Cromatografía de gases multidimensional en modo <i>comprehensive</i> |

H

| | |
|------------|--|
| H/C MDGC | Cromatografía de gases multidimensional en modo <i>heart-cut</i> |
| H/C MDLC | Cromatografía líquida multidimensional en modo <i>heart-cut</i> |
| HF | Fibra hueca |
| HF-LPME | Microextracción en fase líquida con fibra hueca |
| HF(1)-LPME | Microextracción en fase líquida con fibra hueca en dos fases |
| HF(2)-LPME | Microextracción en fase líquida con fibra hueca en tres fases |
| HF-RLM | Membrana líquida renovada con fibra hueca |
| HILIC | Cromatografía líquida de interacción hidrófila |
| HPLC | Cromatografía líquida de alta resolución |
| HS-SDME | Microextracción en gota en espacio en cabeza |

I

| | |
|-----|-------------------------------------|
| IEC | Cromatografía de intercambio iónico |
| IL | Líquido iónico |
| IR | Infrarrojos |
| IS | Estándar interno |

| | |
|-----|-----------------|
| IT | Trampa de iones |
| ITP | Isotacoforesis |

L

| | |
|-------|---|
| LC | Cromatografía líquida |
| LCxLC | Cromatografía líquida multidimensional en modo <i>comprehensive</i> |
| LLE | Extracción líquido-líquido |
| LPME | Microextracción en fase líquida |
| LOD | Límite de detección |
| LOQ | Límite de cuantificación |
| LLLME | Microextracción líquido-líquido-líquido en gota |
| LLME | Microextracción líquido-líquido |
| LMR | Límite máximo de residuo |
| LPME | Microextracción en fase líquida |
| LVSS | <i>Stacking</i> con eliminación de matriz o de largos volúmenes |

K

| | |
|----------|--|
| K_a | Constante de disociación ácida |
| K_H | Constante de Henry |
| K_{ow} | Coefficiente de partición octanol/agua |
| K_{ps} | Constante de solubilidad |
| K_s | Constante de autoprotólisis |

M

| | |
|--------|---|
| MAE | Extracción asistida por microondas |
| MALDI | Ionización/desorción láser asistida por matriz |
| MAME | Extracción micelar asistida por microondas |
| MCPA | Ácido (4-cloro-2-metilfenoxi)acético |
| MCPB | Ácido 4-(4-cloro-2-metilfenoxi)butanoico |
| MEKC | Cromatografía electrocinética micelar |
| MeOH | Metanol |
| MIP | Polímero de impresión molecular |
| MMLLE | Extracción líquido-líquido con membrana microporosa |
| MMSPE | Extracción en fase sólida con membrana microporosa |
| MS | Espectrometría de masas |
| MSPD | Dispersión sólida en la matriz |
| Mw | Masa molecular |
| MWCNTs | Nanotubos de carbono de pared múltiple |

N

| | |
|---------|---|
| Nano-LC | Nanocromatografía líquida |
| NACE | Electroforesis capilar en medios no acuosos |
| NMR | Resonancia magnética nuclear |
| NPD | Detector de nitrógeno-fósforo |
| NSM | <i>Stacking</i> en modo normal |

O

| | |
|------|--------------------------------|
| OCPs | Plaguicidas organoclorados |
| ONPs | Plaguicidas organonitrogenados |
| OPPs | Plaguicidas organofosforados |
| OSPs | Plaguicidas organosulfurados |

P

| | |
|------|---------------------------------------|
| PAHs | Hidrocarburos aromáticos policíclicos |
| PET | Tereftalato de polietileno |
| PP | Polipropileno |
| PSA | Amina primaria/secundaria |
| PTFE | Politetrafluoroetileno |

Q

| | |
|----------|--|
| Q | Cuadrupolo |
| QqQ | Triple cuadrupolo |
| QuEChERS | Método de preparación de muestra “ <i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged y Safe</i> ” |

R

| | |
|------|---------------------------------------|
| RAM | Materiales de acceso restringido |
| RSD | Desviación estándar relativa |
| RTIL | Líquido iónico a temperatura ambiente |

S

| | |
|-------|--|
| S/N | Relación señal/ruido |
| SALDI | Ionización/desorción láser asistida por superficie |
| SC | Colato sódico |
| SDME | Microextracción en gota |
| SDS | Dodecilsulfato sódico |

| | |
|-----------|---|
| SFE | Extracción con fluidos supercríticos |
| SFO-DLLME | Microextracción líquido-líquido dispersiva con gota flotante sólida |
| SLM | Membrana líquida soportada |
| SPME | Microextracción en fase sólida |
| SPE | Extracción en fase sólida |
| SWCNTs | Nanotubos de carbono de pared sencilla |
| SWMR | <i>Stacking</i> con eliminación de matriz o de largos volúmenes |

T

| | |
|-----------|---|
| $t_{1/2}$ | Tiempo de semidesintegración o vida media |
| THF | Tetrahidrofurano |
| TOF | Tiempo de vuelo |
| TPP | Trifenilfosfato |

U

| | |
|-------|---|
| UAE | Extracción con disolvente asistida por ultrasonidos |
| UE | Unión Europea |
| UHPLC | Cromatografía líquida ultra rápida |